

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution au développement d'un vaccin contre le virus respiratoire syncytial bovin

THIRION, Muriel

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT D'UN VACCIN CONTRE LE VIRUS
RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licenciée en Sciences biologiques**

Muriel THIRION
Septembre 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax : + 32(0)81.72.44.20
E-mail : johan.messiaen@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution au développement d'un vaccin contre le virus respiratoire syncytial bovin

THIRION Muriel

Résumé

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV) est responsable d'infections respiratoires chez les bovidés. La maladie touche essentiellement les veaux dans les premiers mois de leur vie. L'incidence économique de cette pathologie est importante pour l'industrie agro-alimentaire. Afin de protéger le cheptel de cet agent pathogène, des vaccins et des protocoles de vaccination ont été élaborés.

Les accidents survenus lors de différents schémas de vaccination laissent toujours planer un « spectre » sur toute nouvelle approche vaccinale RSV.

Le but du projet, dans lequel ce mémoire s'insère, est de développer de nouvelles formes vaccinales en vue de contourner les problèmes liés aux vaccins BRSV « classiques » ; à savoir la présence des anticorps maternels, des réinfections malgré une vaccination, et une exacerbation des symptômes cliniques lors d'une infection ultérieure par une souche sauvage du BRSV.

Pour ces raisons, le matériau vaccinal choisi est le vaccin ADN (ADN plasmidique contenant le gène codant soit pour la protéine d'attachement (protéine G) soit pour la protéine de fusion (protéine F) du BRSV).

Ce mémoire porte sur le développement, la caractérisation et les tests d'immunisation sur modèles murins de systèmes de délivrance de vaccins (SDV) non réplicatifs biodégradables contenant le vaccin plasmidique.

Les SDV testés sont des microparticules de copolymère d'acides lactique et glycolique -PLGA-, rendues cationiques ou non, et des nanoparticules de phosphate de calcium.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2003

Promoteur : J.-J. Letesson

Je tiens à remercier le Professeur Letesson d'abord pour avoir proposé ce sujet qui m'a fait découvrir le monde passionnant de la vaccinologie, et ensuite pour avoir consacré du temps de ses vacances à la lecture de ce mémoire.

Merci aux personnes du labo qui ont partagé ces mois avec moi ;

Merci à toi Nathalie (tu te reconnaîtras !) pour le soutien et tous les conseils dont tu m'as gratifiés ! Merci pour les soirées « labo » !

Merci « aux deux » Christian ! Christian Didembourg pour le temps consacré à m'aider, ... et à me montrer qu'il avait raison ! Christian Evrard, pour les nombreuses fois où il a été me chercher de l'azote liquide ! Merci pour avoir animé le labo !

Merci à ma famille pour le soutien qu'elle m'a apporté durant ces derniers mois.

Papa, merci pour ton intérêt, ton implication et ta critique constructive... toujours à trouver le petit truc en plus !

Maman, merci pour la lecture méticuleuse et pour la grande disponibilité dont tu as fait preuve !

Vincent, merci pour m'avoir sortie de situations informatiques pour le moins « délicates » et pour les nombreux coups de main !

Gaëtan, merci pour les remarques pertinentes d'un futur collègue !

Marraine, merci pour m'avoir accueillie pendant toutes ces semaines de blocus !

Merci à toi Vanessa pour tous les fous rires... ce mémoire n'aurait vraiment pas été le même si tu n'avais pas été là !

Merci à toi Jon pour ton soutien durant tous ces mois... merci à toi et à Sabine...

Merci à Delphine, Emma, les deux Caro.

Merci à toutes les autres personnes qui m'ont aidée d'une façon ou d'une autre lors de ce mémoire.

Abbreviations :

°C	degré Celsius
µg	microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre ou micron
A260	Absorbance à 260 nm
Ac	Anticorps
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AEC	3-amino-9-éthyl carbazole
Ag	Antigène
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène
ARN	Acide RiboNucléique
bp	paire de bases
BRSV	Bovine Respiratory Syncytial Virus
CD	Cluster of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	CytoMégaloVirus
CpG	Cytidine-Phosphate-Guanosine
Da	Dalton
DC	Cellule Dendritique
DCM	DiChloroMéthane
DEAE	DiEthylAminoEthanol
DO	Densité Optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FCS	Fœtal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
g	gramme si pesée, gravité si centrifugation
g/L	gramme par litre
GM-CSF	Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor
h	heure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horse Radish Peroxidase
HRSV	Human Respiratory Syncytial Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interféron
Ig	ImmunoGlobuline = Anticorps
ISCOM	ImmunoStimulating COMplexe
IL	InterLeukine
IM	IntraMusculaire
IV	IntraVeineuse

L	Litre
LB	Luria Bertani
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
mg	milligramme
min	minute(s)
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	milliMolaire
M	Molaire
MM	Masse Molaire
mol	mole
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NK	Natural Killer
nm	nanomètre
o/n	over night (toute la nuit)
ORI	Origine de réplication
p/v	rapport poids/volume
PBS	Phosphate Buffer Saline
pDNAF	plasmide portant le gène codant pour la protéine F, protéine de fusion du BRSV
pDNAG	plasmide portant le gène codant pour la protéine G, protéine d'attachement du BRSV
PLGA	Copolymère d'acides lactique et glycolique
PVA	Acide PolyVinylique
Rc	Récepteur
rpm	rotation par minute
RSV	Virus Respiratoire Syncytial
SC	Sous - Cutanée
SDV	Systèmes de Délivrance de Vaccins
SIDA	Syndrôme d'ImmunoDéficiency Acquis
SV40	Simian Virus 40
t/min	tour par minute
rRNA	ARN ribosomique
tRNA	ARN de transfert
TE	Tris.EDTA
Th	lymphocyte T helper
TMB	TétraMéthylBenzidine
UV	UltraViolet
V	Volt
v/v	rapport volume/volume
W	Watt
Y	gamma
3D	trois dimensions

Table des matières

1. <u>Introduction :</u>	1
1.1.La réponse immunitaire	2
1.2.Vaccins et vaccination	3
1.2.1. Immunisation passive	3
1.2.2. Immunisation active	3
1.2.2.1.Les vaccins « classiques »	3
A. Les vaccins atténués	3
B. Les vaccins inactivés	3
1.2.2.2.Les nouvelles stratégies vaccinales	4
A. Les vaccins vivants atténués par génie génétique	4
B. Les vaccins sous-unitaires	4
C. Les vaccins ADN ou vaccins plasmidiques	5
1.3.Les adjuvants	6
1.3.1. Les adjuvants « classiques »	6
1.3.2. Les systèmes de délivrance de vaccins (SDV)	6
1.3.2.1.Les SDV vivants ou « microbes présents »	7
A. Les vecteurs viraux	7
B. Les vecteurs bactériens	7
1.3.2.2.Les SDV non vivants	7
A. Particules « virus-like »	7
B. Liposomes et lipides cationiques	7
C. ISCOMS	8
D. Particules polysaccharidiques	8
E. Particules de polyesters	8
F. Particules de Phosphate de Calcium (CaPO ₄)	8
1.4.Vaccin ADN	9
1.5.BRSV	11
1.5.1. Le virus	11
1.5.2. La pathogénie	12
1.5.3. Les formes vaccinales	12
1.5.3.1.Etat de la question	12
1.5.3.2.Solutions proposées	13

2. Matériels et Méthodes :	17
2.0. Liste des produits utilisés	17
2.1. Préparation de cellules compétentes	18
2.2. Transformation de cellules compétentes	18
2.3. Purification de l'ADN plasmidique portant le gène codant pour la protéine G, protéine d'attachement du BRSV (pDNAG) (GigaPrep)	19
2.3.1. <i>Protocole de purification</i>	19
2.3.2. <i>Détermination de la quantité d'ADN purifié</i>	20
2.3.3. <i>Détermination de la pureté de la préparation</i>	20
2.3.4. <i>Electrophorèse sur gel d'agarose</i>	21
2.4. Restriction enzymatique	21
2.5. Préparation de microparticules de copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA) chargées d'ADN plasmidique (pDNAG)	22
2.5.1. <i>Encapsulation d'ADN plasmidique (pDNAG) dans des microparticules de copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA)</i>	22
2.5.2. <i>Adsorption d'ADN plasmidique (pDNAG) sur des microparticules de copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA)</i>	23
2.5.3. <i>Calcul des rendements d'encapsulation et d'adsorption</i>	23
2.5.3.1. <i>Dégradation des microparticules au NaOH 1M</i>	23
2.5.3.2. <i>Calcul du rendement d'encapsulation et d'adsorption</i>	23
2.6. Préparation de nanoparticules de Phosphate de Calcium (CaPO_4) chargées d'ADN plasmidique (pDNAG)	24
2.6.1. <i>Encapsulation d'ADN plasmidique (pDNAG) dans des nanoparticules de Phosphate de Calcium (CaPO_4)</i>	24
2.6.2. <i>Adsorption d'ADN plasmidique (pDNAG) sur des nanoparticules de Phosphate de Calcium (CaPO_4)</i>	24
2.6.3. <i>Calcul du rendement d'encapsulation et d'adsorption</i>	25
2.6.3.1. <i>Dégradation des nanoparticules à l'EDTA 100mM</i>	25
2.6.3.2. <i>Calcul du rendement d'encapsulation et d'adsorption</i>	25
2.6.4. <i>Evaluation de la taille des nanoparticules de CaPO_4</i>	25
2.7. Test de digestion à la DNase I	26

2.8. Préalables à l'immunisation	26
2.8.1. <i>Transfection de cellules COS</i>	26
2.8.2. <i>Immunomarquage sur cellules COS</i>	27
2.9. Immunisation parentérale de souris	27
2.10. Techniques immunologiques	27
2.10.1. <i>Collecte des échantillons sanguins</i>	27
2.10.2. <i>Test ELISA</i>	28

3. Résultats et Discussion :

3.1. Préparation du plasmide contenant le gène codant pour la protéine G du BRSV (pDNAG)	29
3.1.1. <i>Préparation de bactéries compétentes et transformation de ces bactéries</i>	29
3.1.2. <i>MiniPrep et Restriction enzymatique</i>	30
3.1.2.1. Purification	30
3.1.2.2. Restriction enzymatique	30
3.1.3. <i>GigaPrep et Restriction enzymatique</i>	32
3.1.3.1. Purification	32
A. Analyse du gel d'agarose	32
B. Détermination de la quantité et du degré de purification de l'ADN purifié	34
3.1.3.2. Restriction enzymatique	34
3.2. Préparation des systèmes de délivrance de vaccins (SDV)	35
3.2.1. <i>PLGA</i>	35
3.2.1.1. Structure chimique du PLGA	35
3.2.1.2. Dégradation du PLGA	35
3.2.1.3. Préparation des microparticules de PLGA	36
A. Encapsulation du pDNAG dans des microparticules de PLGA	36
B. Adsorption du pDNAG sur des microparticules de PLGA	38

3.2.2. <i>Nanoparticules de CaPO₄</i>	40
3.2.2.1.Préparation des nanoparticules de CaPO ₄	41
3.2.2.2.Autres caractéristiques des nanoparticules de CaPO ₄	42
3.2.2.3.Questions résolues	43
3.2.2.4.Questions en suspens	44
3.2.3. <i>Comparaison de différents SDV</i>	45
3.2.3.1.Rendement relatif	45
3.2.3.2.Protection de l'ADN plasmidique contre l'action des DNases	46
3.3.Tests d'immunisation	47
3.3.1. <i>Préalables</i>	47
3.3.2. <i>Tests d'immunisation et tests ELISA</i>	47
 4. Conclusions et Perspectives :	 50
 5. Bibliographie :	 53

1.Introduction

2. Matériels et Méthodes

3. Résultats et Discussion

4. Conclusions et Perspectives

5.Bibliographie

1. Introduction :

Les grandes épidémies des siècles passés, dévastatrices, ne tuaient pas tout le monde, certains y résistaient. L'observation de résistance à la maladie a suscité l'intérêt des savants de l'époque.

Parmi les hypothèses envisagées, une exposition antérieure et une sorte de « mémoire » vis-à-vis de l'agent pathogène même si celui-ci était, *sensu stricto*, totalement inconnu.

On doit les premières « vaccinations » à Jenner (1798) dans son combat contre la variole suivi, un siècle plus tard, par Pasteur (1880), initiateur des vaccins atténués (charbon, rage, choléra).

Dès le début du 20^{ème} siècle, la recherche et la mise au point de vaccins se sont accélérées et développées ; le vaccin est une des grandes avancées de la médecine... tant dans sa formulation prophylactique (hier la rougeole, la rubéole, le tétanos, la tuberculose,... demain le SIDA - syndrome d'immunodéficience acquise -, la malaria) que dans son approche thérapeutique future (cancer) (ref. 55).

Dans sa conception, le principe de la vaccination est simple : mettre l'individu à immuniser au contact de l'agent pathogène – plus précisément avec un ou plusieurs éléments immunogènes de celui-ci –, de telle façon que l'individu développe une réponse immunitaire sans développer la forme sévère de la maladie.

Ainsi protégé, l'individu vacciné pourra, lors d'un contact ultérieur avec l'agent pathogène en question, se défendre efficacement et rapidement contre celui-ci.

Si le principe est simple, les paramètres susceptibles d'influencer la réponse immunitaire sont nombreux ; l'individu lui-même (état de son système immunitaire), son environnement, la présence et la dispersion d'autres agents pathogènes (virus, bactéries), l'apparition de souches plus résistantes et/ou plus virulentes (ref 39).

Les succès rencontrés sont nombreux... les échecs aussi ; il reste encore beaucoup de pathogènes animaux et humains, pour lesquels les vaccins sont soit inefficaces (virus respiratoire syncytial – RSV), soit inexistants (virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ou Plasmodium responsable de la malaria) soit encore sujets à mises à jour régulières vu les capacités mutagéniques de l'agent (Influenzavirus responsable de la grippe). (ref. 17)

Un bon vaccin doit certes générer la protection attendue mais, en outre, être stable, dépourvu d'effets secondaires, facile à fabriquer, à stocker et à véhiculer et ce, au bénéfice du plus grand nombre. (ref. 21)

Cependant, le vaccin seul ne suffit pas, la capacité de réponse du système immunitaire de l'individu est une condition *sine qua non* du succès.

Dans le cadre de ce travail, pour des raisons de simplification, seul l'aspect d'**immunité spécifique** sera envisagé, aspect qui nous intéresse dans le contexte d'une vaccination.

1.1. La réponse immunitaire (ref. 8 et 56)

Lors d'une réponse immunitaire, les **cellules présentatrices d'antigène** (APC), essentiellement les cellules dendritiques (DC), ont un rôle déterminant ; ce sont elles qui vont induire et orienter la réponse immunitaire.

Chez le sujet sain, les DC exercent une fonction de « sentinelle », surtout aux « frontières » de l'organisme: la peau et les muqueuses.

Lorsqu'un agent immunogène (micro-organismes, toxines) pénètre la peau ou les muqueuses, il est « capté » puis internalisé par les DC (par exemple, DC épidermiques de Langerhans), soit par phagocytose, soit par endocytose. Ces DC quittent alors la peau ou les muqueuses par les canaux lymphatiques pour se rendre au ganglion lymphatique drainant. Une partie de l'agent immunogène peut se retrouver sous forme libre dans les canaux lymphatiques et également aboutir au ganglion drainant.

Pendant la migration, les DC ont « apprêté » l'agent immunogène, c'est-à-dire que des peptides issus de l'agent immunogène se retrouvent associés, à la surface des DC, aux structures présentatrices d'antigène (Ag) que sont les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I et de classe II.

Les DC s'installent alors dans la zone para-corticale (zone T) des ganglions lymphatiques où elles vont exposer les complexes CMH/peptides et ainsi activer les **lymphocytes T** spécifiques. Les lymphocytes T helper (Th ou CD4+) sont capables d'interagir avec les complexes peptides/molécules du CMH de classe II, alors que les lymphocytes T cytotoxiques (ou CD8+) sont activés par présentation de complexes peptides/molécules du CMH de classe I. Ces lymphocytes spécifiques activés se divisent et donnent naissance à des lymphocytes T helper et T cytotoxiques effecteurs qui vont pouvoir être recrutés au site inflammatoire. Là, les lymphocytes T helper vont pouvoir jouer leur rôle d'auxiliaire tandis que les lymphocytes T cytotoxiques vont pouvoir exercer leur fonction cytotoxique en induisant l'apoptose (soit via sécrétion de perforines et de granzymes, soit via liaison des ligands Fas à leurs récepteurs spécifiques (Fas Rc) exprimés à la surface des cellules infectées). (cfr fig. 1)

La fraction libre d'agent immunogène qui arrive au niveau du ganglion lymphatique peut interagir avec des **lymphocytes B** porteurs d'Immunoglobuline M (IgM) de surface. La fixation d'un agent immunogène (ou Ag) sur le récepteur du lymphocyte B mène à l'activation du lymphocyte B spécifique, à l'internalisation de l'Ag qui est ensuite apprêté en peptides associés aux molécules du CMH de classe II. Une présentation des complexes CMH II/peptides de surface des lymphocytes B peut ici aussi activer des lymphocytes T helper effecteurs qui vont fournir les signaux nécessaires à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs et sécréteurs d'anticorps (Ac ou Ig). Ces dernières étapes se déroulent, elles, dans les follicules B de la zone corticale externe des ganglions lymphatiques. Les Ac passent alors dans la circulation après avoir subi une étape de maturation et rejoignent le site inflammatoire (cfr fig. 2).

1.2. Vaccins et vaccination

La protection vis-à-vis de différents agents pathogènes peut être obtenue par

1.2.1. immunisation passive

Il s'agit de transférer des Ac spécifiques produits chez un tiers à un individu ayant été ou étant susceptible d'être en contact avec l'agent pathogène contre lequel sont dirigés les Ac sélectionnés.

Le système immunitaire du « receveur » n'est pas « activé » par ce processus.

On retrouve dans cette catégorie la **sérothérapie** ou γ thérapie. Dans ce cas, le transfert d'Ac s'effectue soit par voie intramusculaire (IM), soit par voie intraveineuse (IV), soit encore par application *in situ* d'Ac spécifiques sur les plaies colonisées par des souches multirésistantes (grands brûlés).

L'autre aspect de l'immunisation passive consiste dans le transfert d'**Ac maternels** qui se fait, quant à lui, soit via la voie transplacentaire pendant la grossesse, soit via le colostrum durant la lactation.

1.2.2. immunisation active

Il s'agit ici de stimuler les mécanismes de défense en présentant au système immunitaire tout ou une partie de l'agent pathogène (voire de l'agent pathogène modifié). Il existe différents types de vaccins :

1.2.2.1. Les vaccins « classiques » (ref. 26)

A. Les vaccins atténués

Ces vaccins sont constitués de micro-organismes, vivants, rendus non virulents, mais ayant gardé leur capacité de réplication et leurs propriétés antigéniques, qui simulent une infection naturelle et déclenchent les mécanismes de défense. L'atténuation de leur pouvoir pathogène est obtenue par passages successifs du micro-organisme *in vitro*.

B. Les vaccins inactivés

Une autre méthode « classique » de vaccination consiste à utiliser, non plus des micro-organismes vivants atténués, mais des micro-organismes tués (inactivés). Ces micro-organismes tués ne sont donc plus ni virulents, ni infectieux ; ce sont des sortes de « corps étrangers » qui n'ont conservé que leurs caractéristiques antigéniques. Les micro-organismes sont inactivés par différents moyens, physiques (chaleur) ou chimiques (formaldéhyde, β -propiolactone).

On considère généralement que les vaccins vivants atténués sont plus efficaces. Ils agissent à faible dose et n'exigent en principe pas de rappel (puisque capables de réplication et donc de présentation prolongée), de sorte qu'ils sont souvent bon marché. Mais ils ont aussi leurs limites. Tout d'abord, il n'est pas toujours possible d'atténuer la virulence d'un micro-organisme tout en lui conservant des capacités antigéniques. De plus, il peut arriver qu'un microbe atténué redevienne pathogène. Face à cela, le vaccin inactivé a l'avantage d'être plus sûr, mais il nécessite souvent d'être inoculé à des doses plus élevées et avec des rappels pour induire une bonne immunité à long terme. (ref. 25)

1.2.2.2. Les nouvelles stratégies vaccinales (ref. 25)

Toute une variété de technologies issues du génie génétique permet désormais de concevoir des vaccins totalement nouveaux : vaccins recombinants, vaccins sous-unitaires, vaccins ADN ou ARN... . On cherche ainsi à améliorer les vaccins existants et surtout à mettre au point des vaccins contre les maladies pour lesquelles rien n'est encore disponible. De nouvelles voies d'administration des vaccins (voie mucoale) font également l'objet de nombreux travaux.

A. Les vaccins vivants atténués par génie génétique

Il est désormais possible de créer de nouvelles souches de micro-organismes rendues totalement inoffensives par voie génétique. Il s'agit notamment d'inactiver ou d'éliminer – quand ils sont connus – les gènes responsables de leur pouvoir pathogène ou gènes de virulence. Les bactéries ou virus ainsi atténués ne sont finalement pas très différents des vaccins vivants classiquement atténués. Les micro-organismes ainsi obtenus sont inoffensifs tout en étant reconnus par le système immunitaire comme « identiques » aux souches naturelles.

Le coût de production est moindre. Le risque de réversion vers la virulence est supprimé. Ce qui constitue des avantages non négligeables par rapport aux vaccins classiquement atténués.

B. Les vaccins sous-unitaires

D'immenses progrès ont été réalisés ces dernières années dans l'identification des Ags des virus, des bactéries et des parasites, et surtout dans l'isolement et le clonage des gènes conduisant à la fabrication de ces Ags. La production de molécules immunogènes par génie génétique était devenue possible. Le gène codant pour l'Ag sélectionné peut être introduit dans une bactérie, une levure ou une cellule animale, qui va servir d'« usine biologique » pour la synthèse du dit Ag. Ces Ags « recombinants » sont ensuite purifiés. Ils sont la base des vaccins appelés sous-unitaires. Il ne s'agit donc plus ici d'utiliser des germes entiers pour la vaccination, mais uniquement certaines des séquences antigéniques produites par le micro-organisme. Pour accroître leur pouvoir immunogène, ces Ags sont généralement administrés avec une substance appelée *adjuvant* (cfr point 1.3. ci-dessous).

C. Les vaccins ADN ou vaccins plasmidiques

La vaccination par ADN est un concept totalement novateur en vaccinologie. Il ne s'agit plus là d'administrer des Ags mais d'introduire directement dans certaines cellules de l'organisme le gène codant pour l'Ag vaccinal.

L'idée d'utiliser l'ADN comme support vaccinal vient de l'observation que, de la transfection d'un gène dans une cellule (*in vivo* ou *in vitro* – par différents moyens), résulte l'expression de la protéine codée par ce gène. (ref. 80)

Des recherches ont donc été menées afin d'évaluer le pouvoir vaccinal de l'ADN. (ref. 47 et 73)

Ces recherches ont permis de démontrer que l'ADN peut être utilisé comme moyen de vaccination et qu'il présente de nombreux avantages par rapport aux autres types de vaccins.

En effet, le vaccin ADN permet de produire, localement, dans l'organisme de l'individu à immuniser, l'Ag immunogène encodé par celui-ci. Cet Ag ainsi produit se présente généralement sous sa forme native, en tout point similaire à celui synthétisé lors d'une infection. Il est surtout produit de façon prolongée par les cellules de l'organisme, et cette présentation durable de l'Ag au système immunitaire devrait permettre d'éviter le recours aux rappels pour certains vaccins. Par ailleurs, cette forme vaccinale ne présente aucun risque d'infection post-vaccinale, un point particulièrement important quand il s'agit de vacciner des patients immunodéprimés.

De plus, les vaccins ADN sont susceptibles d'induire tant une réponse humorale qu'une réponse cellulaire et ils semblent induire les mêmes effets protecteurs que les vaccins vivants classiquement atténués, les inconvénients de sécurité et de production en moins.

Les vaccins ADN permettent également de moduler qualitativement et/ou quantitativement la réponse immunitaire ; ils sont facilement manipulables et leur production est assez facile et bon marché.

Ils ont l'avantage d'être relativement stables et faciles à conserver (pas besoin de maintenir une chaîne du froid comme pour les vaccins atténués). (ref. 17)

Différents moyens sont explorés pour améliorer la réponse du système immunitaire vis-à-vis tant du vaccin ADN que d'autres formes vaccinales.

1.3. Les adjuvants (ref. 47)

Les adjuvants (du latin *adjuvare* qui signifie *aider*) se définissent comme des substances capables d'augmenter l'intensité, la durée et/ou la maturation de la réponse immunitaire contre un vaccin au-delà du niveau atteint par la seule administration de l'immunogène. Les mécanismes d'action des adjuvants peuvent être résumés de la façon suivante :

- effet dépôt pour permettre une délivrance lente des substances antigéniques retenues
- effets sur les APC ; activation, recrutement et/ou ciblage des APC
- meilleure présentation des substances antigéniques sélectionnées
- induction de substances immunorégulatrices telles que les cytokines
- activation de réactions inflammatoires locales.

Les adjuvants agissent sur le système immunitaire selon différents modes d'action, mais avec un seul objectif commun : amplifier la réponse du système immunitaire. Aux adjuvants sont liées bon nombre de réactions secondaires propres à l'adjuvant utilisé. Cette toxicité liée aux adjuvants fait l'objet, depuis des années, d'études visant à augmenter la réponse immunitaire tout en réduisant, voire en supprimant totalement, les réactions secondaires du produit.

Il existe deux catégories d'adjuvants : les adjuvants « classiques » et les systèmes de délivrance de vaccins (SDV).

1.3.1. Les adjuvants « classiques »

Les ***adjuvants « classiques »*** comprennent entre autres l'adjuvant de Freund, les sels d'alumine et les saponines.

L'adjuvant de Freund est une émulsion du type eau/huile, utilisé dans le passé pour le vaccin de la grippe (ref. 60).

Les sels d'alumine sont les seuls adjuvants à usage humain autorisés aujourd'hui. Cependant, ils présentent certains inconvénients, comme l'apparition de granulomes au site d'injection, la variation en qualité et en stabilité selon les lots et une incapacité à stimuler l'immunité de type cellulaire.

Les saponines sont des glycolipides d'origine naturelle dont l'activité adjuvante est connue depuis plus d'un demi-siècle. Le QuilA, un extrait brut isolé de l'écorce de l'arbre sud-américain *Quillaja saponaria molina* fait partie de ce groupe. Le QuilA intervient dans la préparation d'un SDV particulier appelé ISCOM (ImmunoStimulating COMplexe).

1.3.2. Les systèmes de délivrance de vaccins (SDV)

Il existe plusieurs types de ***SDV***. Dans tous les cas, les objectifs sont d'une part de protéger le « matériau vaccinal » de l'environnement jusqu'à son arrivée au site d'action et, d'autre part, d'améliorer sa présentation aux cellules capables d'initier une réponse immunitaire (par exemple, les APC) (ref. 47).

Les SDV sont classés en deux grandes catégories : les SDV vivants et les SDV non vivants.

1.3.2.1. Les SDV vivants ou « microbes présentoirs » (ref 25)

Les techniques de génie génétique permettent de faire présenter par des virus ou des bactéries des molécules immunogènes (Ags ou épitopes) d'autres micro-organismes. Les gènes codants pour ces molécules étrangères sont introduits dans les micro-organismes « vecteurs », qui les exprimeront ensuite à leur surface, ou les sécréteront dans le milieu extérieur. Ces SDV peuvent être considérés comme des vaccins vivants recombinants mixtes car ils permettent de vacciner à la fois contre le vecteur et contre l'agent pathogène dont ils présentent les Ags au système immunitaire.

On peut imaginer à terme faire porter par des vecteurs des Ags provenant de plusieurs agents pathogènes différents et obtenir ainsi des vaccins multivalents.

A. Les vecteurs viraux

Parmi les vecteurs viraux, le plus utilisé à ce jour est le virus canarypox.

Administré par voie parentérale, ce vecteur, qui est non virulent et non répliquatif chez les mammifères et qui a été modifié génétiquement pour exprimer le gène codant pour un Ag d'intérêt, est capable « d'infecter » des APC, d'exprimer l'Ag et d'induire une réponse immunitaire. (ref 47)

L'adénovirus (ref 22) et le virus herpès (ref 63) ont également été étudiés comme vecteurs, mais cette fois, réplicatifs.

B. Les vecteurs bactériens

Les vecteurs bactériens les plus étudiés sont *Salmonella typhimurium* (ref. 81) et *Yersinia enterocolitica*. (ref 1 et 68)

1.3.2.2. Les SDV non vivants (ref 25)

Contrairement aux vecteurs vivants présentés plus hauts - exception faite pour le canarypox virus - (cfr point 1.3.2.1.), ces SDV ne se multiplient pas dans l'organisme : ce sont des vecteurs dits « non répliquatifs », qui présentent, pour certains, d'importants avantages en terme de sécurité, tout en restant immunogènes.

A. Particules « virus-like »

L'idée est d'utiliser l'« enveloppe vide » d'un virus pour délivrer le vaccin aux cellules immunitaires. Le système immunitaire reconnaît le « pseudo-virus » et réagit comme s'il avait affaire au virus « complet » (ref. 35)

B. Liposomes et lipides cationiques

Les liposomes sont des vésicules dont la paroi est constituée d'une ou de plusieurs bicouches de nature phospholipidique entourant un espace aqueux. Le terme de liposome ne s'applique qu'à l'entité comprenant une vésicule et une composition renfermant des phospholipides, d'où le terme de lipide employé dans les autres cas (cfr ref. 14 et cfr fig. 3)

Liposomes et lipides sont capables de fusionner avec les membranes biologiques. L'idée est d'exploiter cette fusion à des fins thérapeutiques.

Malheureusement, les liposomes ne sont pas très efficaces et les lipides cationiques présentent un risque de toxicité pour les cellules (ref 36).

C. ISCOMs

Les ISCOMs sont des structures en forme de cage formées par l'association de QuilA (cfr point 1.3.1.), de cholestérol et du matériau vaccinal. (ref. 49)

Ces complexes possèdent une activité adjuvante induisant une très puissante réponse immunitaire à médiation cellulaire, y compris au niveau des muqueuses (ref. 47)

Pour tous les systèmes particuliers qui vont être évoqués ci-dessous, la taille constitue un facteur déterminant de la réponse du système immunitaire. Ainsi, les microparticules (taille inférieure à 10 µm) et les nanoparticules généreront une meilleure réponse immunitaire (ref. 52).

D. Particules polysaccharidiques

L'alginate, dérivée de l'algue, et le chitosan, dérivé de la chitine des coquilles de crustacés, sont des polysaccharides qui possèdent des propriétés mucoadhésives (ref. 82).

E. Particules de polyesters (ref. 66)

Le copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA) est un polyester biodégradable qui permet une libération contrôlée et une protection du matériau vaccinal. L'objectif, dans ce cas, n'est pas d'améliorer la prise par les cellules mais bien de conserver le vaccin ADN dans le meilleur état possible.

F. Particules de Phosphate de Calcium (CaPO₄) (ref. 21)

Tout comme pour le PLGA, les particules de CaPO₄ mises au point récemment sont biodégradables et elles permettent une libération contrôlée du vaccin. Elles sont également capables d'induire une réponse cellulaire (Th1).

Ces SDV non vivants peuvent encore être améliorés en leur ajoutant (par couplage ou non) **un ligand** (une molécule particulière) pour lequel les cellules ciblées possèdent des récepteurs spécifiques. (cfr ref. 16, 65, 69 et 72)

Un autre avantage de ces SDV non vivants : ils peuvent, pour la plupart, être utilisés tantôt par voie systémique, tantôt par voie mucoale.

La voie systémique (intramusculaire - IM -, intraveineuse - IV -, sous-cutanée - SC) induit une réponse immunitaire « généralisée », alors que la voie mucoale (orale, nasale) induit une réponse immunitaire plus « localisée ».

La voie mucoale est de plus en plus exploitée pour une raison simple : la majorité des agents pathogènes interagissent dans un premier temps avec les surfaces muqueuses. Ils adhèrent à l'épithélium puis le colonisent, avec ou sans captation par les cellules M. Les micro-organismes qui entrent ainsi en relation avec les tissus lymphoïdes initient une réponse immunitaire protectrice. Les IgA sécrétoires dirigés contre les facteurs de virulence des agents infectieux jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire locale et il est possible, dans la plupart des cas, d'enrayer une infection en stimulant la sécrétion de ces Ac et donc en empêchant l'étape d'invasion des cellules hôtes. (ref.2)

Il est clair qu'il n'existe pas de SDV universel. Ces systèmes doivent être adaptés aux besoins cliniques et immunologiques qui caractérisent chaque maladie.

1.4. Vaccin ADN

Nous venons de faire le point sur les différents types de vaccins qui existent à ce jour. Parmi ceux-ci, le vaccin ADN semble très prometteur. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une stratégie vaccinale à ADN dans le cadre de ce mémoire.

Il faut cependant savoir qu'un vaccin ADN ne consiste pas uniquement en un gène codant pour une ou des protéine(s) immunogène(s) de l'agent pathogène contre lequel on désire immuniser. Le gène fait partie intégrante d'un vecteur plasmidique dont les caractéristiques vont déterminer la qualité et la spécificité de la transcription ainsi que la qualité et la spécificité de la réponse immunitaire.

Le vecteur plasmidique (cfr fig. 4 et ref. 17)

Les éléments requis pour obtenir un vecteur plasmidique à but vaccinal sont :

1. Le **gène d'intérêt** c-à-d le gène codant pour l'une des protéines immunogènes de l'agent pathogène contre lequel on désire immuniser, protéine dont la présence constitue un facteur d'infectiosité et/ou de virulence ; on peut intégrer plusieurs gènes d'intérêt dans un même vecteur plasmidique.
2. Une **origine de répllication** (ORI) pour la répllication dans des **bactéries**. (L'ORI ColE1 de *E. coli* dans un plasmide pUC est l'option la plus utilisée car générant dans la bactérie un nombre élevé de copies du plasmide).
3. Un **gène de résistance** (généralement un gène de résistance à un antibiotique) qui permet de sélectionner positivement les **bactéries** possédant le plasmide. En effet, seules celles-ci sont capables de croître sur le milieu correspondant.
4. Un **promoteur eucaryotique fort** et une **séquence de polyadénylation** pour une expression optimale dans les cellules de mammifères. Les promoteurs les plus utilisés sont ceux dérivés des virus tels que le cytomégalovirus – CMV – ou le simian virus 40 – SV40 – .
5. Des **motifs Cytidine-Phosphate-Guanosine** (CpG). CpG est un dinucléotide non méthylé qui est flanqué de part et d'autre de régions propres – **spécifiques** de l'espèce (à vacciner) – ; ce **motif idéal** permet de stimuler au mieux la réponse immunitaire. Ces motifs ont donc un rôle d'adjuvant qui permet :
 - d'activer directement les lymphocytes B (prolifération et sécrétion d'Ac),
 - de stimuler la sécrétion de cytokines (messagers) par les APC,
 - d'activer indirectement les cellules Natural Killer (NK) via la sécrétion des cytokines induite par les APC et
 - de stimuler directement ou indirectement les lymphocytes T.(ref. 18 et 34)

Il est à noter que la quantité de motifs CpG insérés dans le vecteur plasmidique va non seulement influencer la quantité d'ADN nécessaire pour induire une réponse immunitaire mais aussi moduler qualitativement cette réponse ; au-delà d'un certain nombre de motifs CpG insérés dans le vecteur, l'effet obtenu s'inverse ; il devient inhibiteur. (ref. 37)

Malgré le potentiel vaccinal de l'ADN plasmidique, les nucléases présentes *in vivo* provoquent une dégradation rapide de celui-ci. Or, il est important de pouvoir amener l'ADN à l'endroit souhaité avant que celui-ci ne soit dégradé. Il est également important de pouvoir induire une immunisation à long terme. L'utilisation d'adjuvants s'est donc imposée comme la solution à adopter ; parmi ceux-ci, les SDV (cfr point 1.3.2. page 6), qui font l'objet de nombreuses études (ref. 1, 4, 27, 47 et 81).

1.5. BRSV

1.5.1. Le virus

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV) a été découvert vers 1970. Il doit son nom à l'effet cytopathogène qu'il provoque.

Le BRSV est classé dans le genre Pneumovirus, famille des Paramyxoviridae, sous-famille des Pneumovirinae et ordre des Monogavirales.

La sous-famille des Pneumovirinae présente deux grandes caractéristiques qui la différencient des autres Paramyxoviridae. La première est la présence d'une protéine de fusion autre que la neuraminidase, la protéine F, qui induit la fusion des cellules menant à la formation de cellules syncytiales. (cfr fig. 5). La seconde est l'absence d'activité hémagglutinante. (ref 39)

Le BRSV (cfr fig. 6) possède en outre une enveloppe provenant de la membrane de la cellule infectée. Son génome est constitué d'un **ARN négatif simple brin non segmenté** qui code pour dix protéines.

Parmi ces dix protéines, deux ont été identifiées et reconnues comme étant les plus **immunogènes**. Il s'agit de la protéine de **fusion**, la protéine F et de la protéine d'**attachement**, la protéine G. (ref 41 et 42)

Attachement et fusion sont des étapes indispensables à la pénétration cellulaire du virus.

La protéine F est une protéine glycosylée qui se trouve en surface du virus. Elle est responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule infectée ainsi que de la fusion entre les membranes des cellules infectées (et donc responsable de la formation de cellules syncytiales – cfr fig. 5).

La protéine G se trouve également en surface du virus. C'est une protéine très glycosylée responsable de l'attachement du virus à la cellule.

Cet attachement constitue la première étape du cycle infectieux du virus.

Il est donc intéressant de pouvoir neutraliser les activités de ces deux protéines – empêchant ainsi la genèse du cycle viral.

1.5.2. La pathogénie (cfr ref. 39 et 40)

Le BRSV est une des causes majeures d'infection respiratoire chez les bovidés. Il a une prédilection pour l'appareil respiratoire inférieur. Il peut endommager l'épithélium du tractus respiratoire (ref. 33) et donc être directement responsable d'infections secondaires en facilitant l'invasion du poumon par d'autres agents pathogènes (ref. 5).

La maladie touche essentiellement les veaux dans les premiers mois de leur vie.

La morbidité et la mortalité causées par le BRSV sont responsables de pertes économiques importantes. En effet, la fréquence et la sévérité des symptômes causés par le virus se sont accrues parallèlement à l'intensification de l'élevage industriel.

Différents facteurs déterminent cependant la sévérité des symptômes ; l'animal (état de son système immunitaire), l'environnement dans lequel il vit (hygiène, conditions d'hébergement, climat), la gestion du cheptel (nombre d'animaux par m², facteurs de stress, mesures prophylactiques,...) ainsi que la présence et la dispersion d'autres agents infectieux (virus, bactéries).

1.5.3. Les formes vaccinales

L'approche vaccinale s'est donc très vite révélée primordiale. Pour cela, une étude de l'agent pathogène est indispensable, afin d'élaborer un vaccin qui soit le plus efficace possible.

1.5.3.1. Etat de la question

Le BRSV, comme tout virus, est un agent *intracellulaire*. Il est donc important de pouvoir induire une réponse immunitaire *cellulaire* afin d'éliminer les cellules infectées par ce virus (cfr fig. 1).

Les formes sévères d'infection s'observent surtout chez les jeunes *veaux sous couvert colostral*. L'approche vaccinale est donc plus délicate. En effet, deux problèmes se posent.

D'une part, le système immunitaire du jeune est en plein développement. Une vaccination prématurée peut induire un phénomène dit de tolérance, c-à-d que le jeune va considérer les molécules immunogènes comme faisant partie de son organisme et ne développera pas de réponse immunitaire lors d'un contact futur avec ces molécules.

D'autre part, étant sous couvert colostral, il possède dans son organisme les Ac de sa mère. Ainsi, si celle-ci a déjà été en contact avec l'agent pathogène contre lequel on souhaite immuniser, ces Ac élimineront les molécules immunogènes avant que le jeune n'ait le temps de répondre à l'agression.

Le virus est, comme son nom l'indique, un virus respiratoire. L'atteinte porte donc essentiellement sur les *voies respiratoires*. La meilleure approche vaccinale est donc d'induire une protection *locale* pour bloquer ainsi la voie d'accès du BRSV.

Enfin, de nombreux cas observés montrent qu'une primo-vaccination ne met pas à l'abri de *réinfection*. L'approche vaccinale doit donc permettre de protéger le sujet pendant la période la plus longue possible. Deux voies sont donc envisageables ; soit on prévoit un calendrier de vaccination (1,3,5 doses espacées de x semaines, mois, années) afin de disposer d'un effet booster, soit on opte pour un vaccin susceptible d'induire une *immunité à long terme*.

1.5.3.2.Solutions proposées

Les premières formulations vaccinales testées sont les vaccins « classiques », à savoir des vaccins atténués et des vaccins inactivés.

Rispoval® RS fut le premier **vaccin vivant atténué** disponible (1977) (ref. 13). Il a été obtenu par atténuation d'une souche virale par passages successifs sur des cultures cellulaires (ref. 77 et 78). De nombreuses expériences ont montré l'efficacité et la sûreté de ce vaccin (ref. 78). Cependant, des complications sévères ont été observées dans un cheptel à l'occasion d'une vaccination en période d'infection naturelle par le BRSV (ref. 32).

Aujourd'hui, il existe différents vaccins BRSV atténués disponibles sur le marché (ref. 62).

Les accidents liés à l'utilisation de **vaccins inactivés** sont beaucoup plus nombreux. Des taux élevés de mortalité et de morbidité (ref. 40 et 62) ont notamment été observés avec le Vacorès®, un vaccin inactivé au β -propiolactone (ref. 62).

Les **problèmes rencontrés**, tant pour les vaccins inactivés que pour les vaccins atténués, sont dûs à un phénomène immunopathologique lié à une exacerbation de la réponse immunitaire, phénomène qui se produit après la vaccination BRSV, lors d'une infection naturelle au BRSV (ref. 62).

Ce phénomène immunopathologique se caractérise entre autres par une activation des mastocytes et par une infiltration massive d'éosinophiles au niveau des poumons qui conduisent à une hyperactivité bronchiolique. L'exacerbation tire son origine d'une mauvaise orientation de la réponse immunitaire.

Nous avons vu au point 1.1. (page 2) qu'il existe des lymphocytes T helper et que ces lymphocytes interviennent tant dans la réponse humorale (cfr fig. 2 page 2) que la réponse cellulaire (cfr fig. 1 page 2). Il existe deux types de lymphocytes T helper, les **Th1** et les **Th2**, issus de la différenciation d'un lymphocyte T helper Th0. La différenciation de ce lymphocyte vers l'un ou l'autre type dépend d'un jeu de cytokines, messagers de petits poids moléculaires sécrétés par une cellule pour modifier son propre comportement ou celui d'une autre cellule (cfr fig. 7 et ref. 54).

La différenciation du Th0 en Th1 va favoriser une réponse cellulaire alors que la différenciation en Th2 va favoriser une réponse humorale.

Il est cependant important qu'un certain équilibre Th1/Th2 soit maintenu. En effet, le tableau 1 montre comment un déséquilibre Th1/Th2 peut être engendré et comment il peut faire basculer la balance d'un effet protecteur à un phénomène pathologique.

De nouvelles approches vaccinales ont été envisagées afin de résoudre le problème rencontré avec les vaccins « classiques ».

L'équipe de Schmidt a mis au point un **vaccin BRSV vivant recombinant atténué génétiquement**. Ce vaccin, administré par voie mucosale à des veaux, a généré une **protection** contre une infection ultérieure par le BRSV (ref. 61).

Une autre équipe a tenté une immunisation avec un **peptide dérivé de la protéine G du BRSV**. Cette vaccination par voie intrapéritonéale a conféré, chez des souris, une **protection** contre une infection ultérieure par le BRSV. Par contre, administrée par voie intramusculaire chez des veaux, cette forme vaccinale n'a **pas** induit **de protection** au niveau des voies respiratoires supérieures lors d'une infection ultérieure par le BRSV **mais a réduit l'incidence de pneumonie associée au virus** (ref. 6).

Certains se sont servis de « **microbes présentoirs** » (cfr point 1.3.2.1. page 7) pour présenter les molécules immunogènes au système immunitaire du sujet à immuniser.

L'équipe de Taylor a utilisé un **virus recombinant de la vaccine** pour exprimer soit la protéine F, soit la protéine G soit encore la protéine N (protéine du complexe ribonucléoprotéique, cfr fig. 6) du BRSV. Chacune de ces formes vaccinales, administrée par voie intradermale et intratrachéale à des veaux, a induit une **protection contre le développement de lésions pulmonaires** lors d'une infection ultérieure par le BRSV. (cfr ref. 71)

Cette équipe a également utilisé le **virus herpès bovin-1 (BHV-1) recombinant** pour exprimer la protéine G du BRSV. Cette forme vaccinale, administrée par voie intranasale et intratrachéale à des veaux, a, comme pour le peptide ci-dessus, **réduit l'incidence de pneumonie associée au virus** lors d'une infection ultérieure par le BRSV (ref. 70).

Sharma et al. ont, quant à eux, exprimé la protéine F du BRSV dans un **baculovirus**. Cette forme vaccinale, administrée par voie sous-cutanée à des agneaux, a induit une **diminution de la prolifération** du virus dans les sécrétions nasales lors d'une infection ultérieure par le BRSV (ref. 64).

Le **virus herpès bovin-1 (BHV-1) recombinant** utilisé, comme Taylor et al., pour exprimer la protéine G du BRSV, a été étudié par Schrijver et al.. Dans ce cas, la forme vaccinale, administrée par voie intranasale et intratrachéale à des veaux, a généré une **protection** contre une infection ultérieure par le BRSV ou le BHV-1 (ref. 63).

Cette équipe s'est aussi intéressée à une autre forme vaccinale, un **vaccin ADN plasmidique** contenant le même gène que celui incorporé dans le BHV-1. Cette forme vaccinale a été administrée à des veaux par voie intradermique et intramusculaire. Il semble que la protection contre une infection ultérieure par le BRSV ait été moins efficace que dans le cas ci-dessus. Cependant, ils ont observé une **diminution de la prolifération** du virus (ref. 63).

Il faut cependant souligner que les stratégies vaccinales contre le BRSV sont étroitement liées à celles contre son équivalent humain, le HRSV.

Tout comme pour le BRSV, la vaccination HRSV a connu des accidents, accidents qui ont marqué la vaccination RSV, tant chez l'homme que chez le bovin (ref. 31).

La vaccination HRSV a fait et fait encore l'objet d'études beaucoup plus nombreuses que la vaccination BRSV car il n'existe encore actuellement aucun vaccin « humain » sûr et efficace qui ait émergé pour être commercialisé.

Différentes formes vaccinales du HRSV ont donc été élaborées.

Ainsi, l'équipe de Bukreyev a tenté une immunisation avec un **HRSV recombinant exprimant la cytokine GM-CSF** (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor). Ils ont choisi cette cytokine car elle permet la différenciation et la maturation des DC, dont on a vu l'importance au niveau de la réponse immunitaire au point 1.1. page 2. Cette forme vaccinale, administrée par voie intranasale à des souris, a induit une **atténuation de la réplication et une augmentation du taux d'APC dans les poumons** lors d'infection ultérieure par le HRSV (ref. 9).

L'équipe de Huang a, quant à elle, tenté une immunisation avec un **HRSV recombinant encapsulé dans un liposome** particulier constitué de lipides bactériens immunogènes. Cette forme vaccinale, administrée à des souris par voie intranasale, a induit une **protection** contre une infection ultérieure par le HRSV (ref. 24).

Certains ont choisi d'utiliser des **vecteurs vivants**, comme Cano et al. qui ont utilisé une bactérie recombinante, *Staphylococcus carnosus*, pour exprimer un peptide dérivé de la protéine G du HRSV. Cette forme vaccinale, administrée à des souris par voie intranasale, n'a pu induire qu'une **protection partielle** contre une infection ultérieure par le HRSV (ref. 11).

Beaucoup se sont intéressés aux formes vaccinales exploitant le **vaccin ADN**.

Miller et al. ont utilisé un **plasmide contenant le gène codant pour la protéine G du HRSV**. Cette forme vaccinale, administrée par voie intradermique à des souris, a induit une **inhibition de la réplication et une protection contre l'hyper-réactivité des voies respiratoires** (asthme) induite par le HRSV après une infection ultérieure par le HRSV (ref. 48).

Li et al. ont, quant à eux, utilisé un **plasmide contenant le gène codant pour la protéine F du HRSV**. Cette forme vaccinale, administrée par voie intradermique à des souris, a induit plutôt une réponse de type Th2, alors qu'administrée par voie intramusculaire, elle induit des réponses équilibrées Th1/Th2.

Ces auteurs ont cependant observé qu'un rappel avec ce vecteur plasmidique peut faire basculer une réponse de type Th2 vers une réponse de type Th1.

Lors d'une infection ultérieure, ils ont observé une **protection** contre le HRSV et une **expression élevée d'IFN γ dans les poumons** (ref. 44).

Un déséquilibre identique de la réponse immunitaire vers Th2 est également observé lorsqu'on administre un vaccin ADN par la méthode dite du « gene gun » ou « canon à particules ». Cette méthode consiste à adsorber sur des billes d'or des plasmides contenant le gène d'intérêt. Ces microparticules sont alors projetées au niveau de la peau le plus souvent par décharge électrique (ref. 2).

L'équipe de Bembridge a, quant à elle, utilisé un **plasmide contenant le gène codant soit pour la protéine F, soit pour la protéine G du HRSV**. Cette forme vaccinale, administrée à des souris par « **gene gun** », a induit une **réponse orientée préférentiellement Th2**, ce qui fait dire que ce mode de délivrance n'est pas idéal pour une vaccination virale (ref. 7).

Certains auteurs ont cherché à améliorer les réponses obtenues avec un vaccin plasmidique administré seul.

Park et al. ont voulu voir l'effet que pouvait engendrer l'*ajout de cytokines à un vaccin plasmidique contenant le gène codant pour la protéine F du HRSV* sur la réponse immunitaire. Ils ont donc co-administré un plasmide contenant le gène codant pour le GM-CSF ou pour l'IL-4 (deux cytokines induisant le type Th2, cfr fig. 7) ou encore codant pour l'IFN γ (cytokine induisant le type Th1, cfr fig. 7).

Ces différentes combinaisons vaccinales, administrées à des souris par voie intramusculaire et intradermique, ont montré un *effet modulateur* des cytokines *sur la réponse immunitaire*. Dans leur expérience, l'IL-4 et le GM-CSF ont amélioré la réponse humorale alors que l'IFN γ a amélioré la réponse cellulaire (ref. 53).

L'équipe d'Iqbal a utilisé un *vaccin plasmidique contenant le gène codant pour un fragment de la protéine M2, une protéine de la matrice du HRSV* (cfr fig. 6). Ce vaccin plasmidique a été administré *sous forme de nanoparticules de chitosan* à des souris par voie intranasale ou intradermique. Cette vaccination a induit une *diminution de la prolifération du virus* lors d'une infection ultérieure par le HRSV(ref. 27).

Tous ces exemples de vaccination montrent combien nous pouvons faire preuve d'imagination et d'ingéniosité pour tenter d'obtenir le meilleur vaccin RSV qui soit (ref. 21). Ces exemples nous montrent aussi combien une petite modification de la formulation vaccinale (forme vaccinale et/ou voie d'administration) peut engendrer des grandes modifications de la réponse immunitaire.

2. Matériels et Méthodes :

2.0. Liste des produits utilisés

Acétate de Sodium, MM: 82,03 g/mol	Merck
Acide nalidixique	
Acide orthophosphorique (H ₃ PO ₄), MM: 98 g/mol	VWR International
Acide PolyVinylique (PVA), MM: 13000-23000, hydrolysé à 87-89%	Aldrich Chemical
Agarose pour gel d'électrophorèse	Invitrogen
Ampicilline (100 µg/ml)	Roche
Anticorps monoclonal de lapin anti-IgG de souris couplé à la peroxydase	Dako
Anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de fusion du BRSV	
Anticorps monoclonal dirigé contre la protéine d'attachement du BRSV	
Bleu de Bromophénol, MM: 669,96 g/mol	Merck
Bromure d'éthidium, 10 mg/ml	BIO-RAD
Cellobiose, MM: 342,3 g/mol	Sigma
CetylTriméthylAmmonium Bromide (CTAB), MM: 364,46 g/mol	Merck
Chlorure de Calcium (CaCl ₂), MM: 147,02 g/mol	Merck
Citrate de Sodium (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O), MM: 294,1 g/mol	Vel
Copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA)	Boehringer Ingelheim
Resomer RG 505, Ratio 50-50, MM: 65000 Da	
DiChloroMéthane (DCM), MM: 84,93 g/mol	Merck
DNase I, 2000 unités/mg	Roche
EDTA.2H ₂ O, MM: 372,24 g/mol	Janssen Chimica
Enzymes de restriction <i>Hind III</i> et <i>Nhe I</i> + tampon M	Roche
Ethanol, MM: 46,07 g/mol	VWR International
Glycérol, MM: 92 g/mol	VWR International
Hydrogénophosphate de Sodium (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O), MM: 177,99 g/mol	Merck
Hydrolysate de caséine	
Isopropanol, MM: 60,1 g/mol	VWR International
Kit de purification Qiagen Endofree Plasmid Giga and Mini Kit	Qiagen
Lipofectamine TM et produits pour la transfection en cellules COS	Gibco BRL
Luria Bertani (Tryptone 1%; NaCl 0,5% ;extraits de levure 0,5%; en p/v)	
LB + Agar (32g/L)	Gibco BRL
LB Broth Base (20g/L)	Invitrogen
Mannose, MM: 180,16 g/mol	Merck
Marqueur de poids moléculaire HyperLadder I	Bioline
NaOH, MM: 40 g/mol	Vel
PBS Tween	BioX
Phosphate Buffer Saline (PBS)	BioX
RNase A (100 µg/ml)	Macherey-Nagel
Sucrose, MM: 342,3 g/mol	Gibco BRL
Tampon de migration électrophorétique TAE	
Solution contenant l'AEC et l'H ₂ O ₂	BioX
Solution contenant le TMB et l'H ₂ O ₂	BioX
Streptomycine	
Xylène cyanol, MM: 538,62 g/mol	Merck

2.1. Préparation de cellules compétentes

1. Etaler sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solide (Luria Bertani + Agar, Invitrogen, 32g/L) un stock décongelé de bactéries *E.coli* **Tg1** (génotype : *supE thi-1 Δ(lac-proAB)Δ(mcrB-hsdSM)5* (r^k⁻,m^k⁻) [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*]) cryopréservées dans du glycérol 30% (v/v) et laisser pousser o/n dans l'étuve à 37°C.
2. Inoculer une colonie isolée de Tg1 provenant de cette boîte dans 10 ml de LB liquide (LB Broth Base, Gibco BRL, 20 g/L) stérilisé au préalable (autoclave pendant 20 min) et laisser pousser o/n à 37°C sous agitation continue à 125 t/min (E. Bühler SM 25).
3. Inoculer 2 ml de cette préculture dans 200 ml de LB liquide stérilisé au préalable et maintenir à 37°C sous agitation continue à 125 t/min (E. Bühler SM 25).
4. Lorsque la DO, mesurée à 600nm (Pharmacia LKB-Ultrospec Spectrophotometer), se situe entre 0,3 et 0,4 , retirer la culture de l'étuve et la mettre sur glace 10 min.
5. Centrifuger à 3000 rpm (Sorvall RC-5B) pendant 10 min à 4°C afin d'isoler le culot bactérien.
6. Eliminer le surnageant et remettre le culot en suspension dans 40 ml d'une solution glacée stérile de CaCl₂ 60 mM contenant du glycérol 15 % (v/v).
7. Centrifuger la suspension à 2500 rpm (Sorvall RC-5B) pendant 5 min à 4°C.
8. Répéter l'étape n°6.
9. Après une incubation de 30 min sur glace, la suspension est centrifugée à 2500 rpm (Sorvall RC-5B) pendant 5 min à 4°C.
10. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 8 ml de la solution glacée stérile de CaCl₂ 60 mM contenant du glycérol 15 % (v/v).
11. La suspension est stockée à -80°C par aliquot de 400 µl.

NB : Pour les autres souches testées (à savoir DH10B, DH5α et MC1061, cfr point 3.1.1. de la partie « Résultats et Discussion » page 29), le protocole et les conditions sont identiques excepté le milieu de culture des étapes 1 et 2 qui contient en plus un antibiotique. La présence et le type d'antibiotique sont fonction du génotype de chaque souche. DH5α est résistant à l'acide nalidixique (25µg/ml de LB), DH10B et MC1061 sont résistants à la streptomycine (30 µg/ml de LB).

2.2. Transformation de cellules compétentes

1. Décongeler un des aliquots (400µl) préparés au point 2.1.
2. Mettre 200 µl de cellules compétentes en contact avec 20 µl de la solution plasmidique (pDNAG, 10 ng/10 µl).
3. Mettre sur glace 20 min.
4. Déposer dans le bain à 42°C pendant 2 min.
5. Ajouter 1 ml de milieu LB liquide *sans antibiotique*.
6. Incuber 30 min dans l'étuve à 37°C.
7. Prélever 50 µl et étaler sur gélose *contenant de l'ampicilline* (LB Agar + ampicilline (100 µg/ml)).
8. Incuber o/n dans l'étuve à 37°C.

2.3. Purification de l'ADN plasmidique portant le gène codant pour la protéine G, protéine d'attachement du BRSV (pDNAG) (GigaPrep)

2.3.1. Protocole de purification (cfr fig. 8)

Le protocole de Qiagen (manuel 12/2002) a été modifié en vue d'améliorer la quantité de plasmide purifié récolté.

1. Inoculer une colonie isolée de Tg1 transformée avec pDNAG dans 10 ml de LB liquide stérilisé au préalable (autoclave, 20 min) contenant 1 mg d'ampicilline et laisser pousser ~ 8 h à 37°C sous agitation continue à 125 t/min (E. Bühler SM 25).
2. Inoculer 5 ml de cette culture dans 2,5 L de LB liquide stérilisé contenant 250 mg d'ampicilline et laisser pousser entre 12 et 16 h à 37°C sous agitation continue à 125 t/min (E. Bühler SM 25).
3. Centrifuger à 3500 rpm (Jouan CR 412) pendant 25 min à 4°C pour isoler le culot bactérien puis éliminer le surnageant en retournant la bouteille de centrifugation ouverte.
4. Remettre en suspension le culot bactérien dans 125 ml de Tampon P1 (tampon de remise en suspension) auquel on a préalablement ajouté la RNase A (100 µg/ml).
5. Ajouter 125 ml de Tampon P2 (tampon de lyse), mélanger quelques fois par inversion jusqu'à l'obtention d'un fluide visqueux.
6. Laisser incubé **exactement** 5 min à température ambiante.
7. Ajouter 125 ml de Tampon P3 froid (tampon de neutralisation) et mélanger plusieurs fois par inversion jusqu'à ce que le fluide ne soit plus visqueux.
8. Visser le filtre *Qiagen Mega-Giga Cartridge* à une bouteille en verre d'un litre (45mm de diamètre de goulot), brancher le tout à la trompe à vide et verser le lysat sur ce filtre.
9. Laisser incubé 10 min à température ambiante puis ouvrir la vanne de la trompe à vide pour permettre le passage du liquide.
10. Verser ensuite 50 ml de Tampon FWB (tampon de lavage du filtre) sur le filtre *Qiagen Mega-Giga Cartridge* et mélanger doucement.
11. Prélever 75 µl du lysat filtré pour le gel d'agarose (cfr point 2.3.4.).
12. Ajouter 30 ml de Tampon ER (tampon d'élimination des endotoxines) au filtrat, mélanger une dizaine de fois par inversion.
13. Incuber sur glace pendant 30 min.
14. Verser le lysat filtré issu de l'étape 13 sur la colonne *Qiagen-tip 10000* équilibrée au préalable avec 75 ml de Tampon QBT (tampon d'équilibration).
15. Récolter le liquide s'écoulant de la colonne et en prélever 75 µl pour le gel d'agarose (cfr point 2.3.4.).
16. Laver la colonne *Qiagen-tip 10000* avec 600 ml de Tampon QC (tampon de lavage de la colonne).
17. Récolter le liquide s'écoulant de la colonne et en prélever 120 µl pour le gel d'agarose (cfr point 2.3.4.).
18. Eluer l'ADN avec 75 ml de Tampon QN (tampon d'élution).
19. Récolter le liquide s'écoulant de la colonne et en prélever 15 µl pour le gel d'agarose (cfr point 2.3.4.).
20. Laver la colonne *Qiagen-tip 10000* avec 100 ml d'eau distillée.
21. Conserver les 50 premiers ml récoltés (pour récupérer l'essentiel de l'ADN résiduel) et en prélever 20 µl pour le gel d'agarose (cfr point 2.3.4.).
22. Equilibrer la colonne *Qiagen-tip 10000* avec 50 ml de Tampon QBT ; la colonne est prête pour une nouvelle utilisation.

23. Verser le liquide récolté à la fin de l'étape 15 sur la colonne ré-équilibrée.
24. Répéter les étapes 15 à 19 (voire à 22).
25. Procéder de la même façon qu'aux étapes 23 et 24 mais cette fois, avec le liquide récolté à la fin de l'étape 23.
26. Précipiter l'ADN en ajoutant 52,5 ml d'isopropanol, à température ambiante, à l'éluat récolté à l'étape 19. Idem pour celui récolté lors des étapes 24 et 25. Bien mélanger.
27. Précipiter l'ADN en ajoutant 40 ml d'isopropanol à température ambiante et 9 ml d'Acétate de Sodium 3M pH 5,2 à température ambiante à l'éluat récolté aux étapes 21 et 24. Bien mélanger.
28. Centrifuger immédiatement après l'étape 26 à 15000 g pendant 30 min à 4°C. Idem pour l'étape 27.
29. Eliminer le surnageant *sans toucher* le culot.
30. Ajouter au culot d'ADN 10 ml d'éthanol 70 % à température ambiante.
31. Centrifuger immédiatement après à 15000 g pendant 10 min à 4°C.
32. Eliminer le surnageant *sans toucher* le culot.
33. Sécher le culot au Speed Vac (Speed Vac Concentrator – Savant).
34. Dissoudre le culot d'ADN dans du Tampon TE (tampon Tris-EDTA).
Le volume de Tampon TE dépend de la concentration souhaitée ; en général, les volumes choisis sont 1,5 ; 1 ou 0,5 ml.

2.3.2. Détermination de la quantité d'ADN purifié

La concentration en ADN est déterminée en mesurant la DO à 260 nm de la solution issue de l'étape 34.

Sachant qu'une DO de 1,000 = 50 µg d'ADN /ml de solution, on calcule la quantité d'ADN récoltée grâce à la valeur obtenue.

2.3.3. Détermination de la pureté de la préparation

La pureté de la préparation est déterminée en mesurant la DO à 280 nm de la solution issue de l'étape 34.

On calcule le rapport DO à 260 nm (obtenue au point 2.3.2.) / DO à 280 nm ; celui-ci doit être supérieur à 1,8 pour que la préparation soit considérée comme purifiée.

2.3.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

2 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) ; xylène cyanol 0,25 % (p/v) et sucrose 20 % (p/v)) sont ajoutés à chaque échantillon (2 µl) à tester (cfr étapes protocole du point 2.3.1.).

On charge ensuite le mélange (4µl/puits) sur un gel d'agarose 0,8 % (0,8 g pour 100 ml de tampon de migration TAE) auquel on a ajouté 5 µl de bromure d'éthidium.

Le gel est placé dans une cuvette d'électrophorèse remplie de tampon de migration TAE (Tris-acétate 40mM, EDTA 1mM, pH 8,0).

La migration s'opère pendant 1h30 à 80 V.

La visualisation des bandes est rendue possible grâce aux UV qui mettent en évidence le bromure d'éthidium qui s'est intercalé dans la double hélice d'ADN.

De plus, la taille des bandes peut être évaluée grâce à la migration concomitante d'un standard de taille (Bioline HyperLadder I).

Ce gel est surtout utile en cas de ***problèmes lors de la purification*** ; il permet en effet de déterminer à quelle étape de la procédure le problème s'est produit.

2.4. Restriction enzymatique

1. Prélever un échantillon (2µl) pour chaque éluat obtenu lors de la purification plasmidique (avec le tampon QN et avec l'eau distillée, cfr point 2.3.1.).
2. Ajouter y 1 µl de l'enzyme de restriction *Hind* III (et 1 µl de l'enzyme de restriction *Nhe* I pour la miniprep) et 2 µl de tampon M.
3. Porter à volume final de 20 µl avec de l'eau distillée.
4. Homogénéiser et incubé 1h45 à 37°C.
5. Ajouter 2 µl de tampon de charge (cfr ci-dessus, point 2.3.4.) et faire migrer en concomitance avec les échantillons correspondants non restreints sur un gel d'agarose 0,8% dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus (cfr point 2.3.4.).
La visualisation et l'évaluation de la taille des fragments obtenus se font comme décrit ci-dessus (cfr point 2.3.4.).

2.5. Préparation de microparticules de copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA) chargées d'ADN plasmidique (pDNAG)

2.5.1. Encapsulation d'ADN plasmidique (pDNAG) dans des microparticules de copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA) (cfr fig. 9)

La méthode utilisée s'inspire de la méthode dite de la *double émulsion* ou *water – in – oil – in – water emulsion* décrite par Jeffery et al. (ref 30).

1. Dissoudre le polymère (PLGA, Resomer RG 505, Boehringer Ingelgheim, Ratio acide lactique - acide glycolique : 50-50, MM: 65000 Da) dans le solvant organique – le DCM – (5%, p/v) et homogénéiser \Rightarrow **Solution A**.
2. Dissoudre l'agent tensioactif – le PVA – dans de l'eau distillée (5%, p/v), chauffer (50°C) et homogénéiser \Rightarrow **Solution B**.
3. Ajouter 1 ml de la solution aqueuse contenant l'ADN plasmidique (2mg/ml ou 1mg/ml) à 10 ml de la **solution A**.
4. Mélanger le tout à l'Ultra-Turrax (modèle T25 - IKA Laboratory Technology) pendant 5 min à 8000 rpm et à température ambiante dans un berlin de 20 ml.
(= *première émulsion*)
5. Ajouter 2,5 ml de cette première émulsion aux 50 ml de la **solution B** contenus dans un berlin de 100 ml.
6. Mélanger le tout à l'Ultra-Turrax (T25 - IKA Laboratory Technology) pendant 5 min à 8000 rpm et à température ambiante. (= *deuxième émulsion*)
7. Répéter 3 X les étapes 5 et 6.
8. Laisser les microparticules se solidifier par évaporation du solvant organique (le DCM) o/n à température et pression ambiantes sous agitation magnétique (~ 400 t/min ; VarioMag Electronicrührer Poly 15).
9. Centrifuger les microparticules pendant 20 min à 3000 rpm à 20°C (Centrifugeuse 4225).
10. Eliminer le surnageant.
11. Remettre en suspension le culot dans 10 ml d'eau distillée.
12. Centrifuger pendant 20 min à 3000 rpm à 20°C (Centrifugeuse 4225).
13. Eliminer le surnageant.
14. Répéter 2 X les étapes 11, 12 et 13.
15. Remettre en suspension le culot dans 1 ml d'eau distillée.
16. Répartir la suspension dans deux petites fioles de lyophilisation.
17. Congeler dans de l'azote liquide et lyophiliser pendant 24 h (Heto Dry Winner CD 8010 Vacuum Chamber).
18. Conserver les microparticules lyophilisées à 4°C jusqu'à utilisation.

2.5.2. Adsorption d'ADN plasmidique (pDNAG) sur des microparticules cationiques de copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA) (cfr fig. 10)

La méthode utilisée s'inspire de la technique décrite par Singh et al. (ref 66).

1. Dissoudre le polymère (PLGA, Resomer RG 505, Boehringer Ingelheim, Ratio acide lactique - acide glycolique : 50-50, MM: 65000 Da) dans le solvant organique – le DCM – (5%, p/v) et homogénéiser \Rightarrow **Solution A**.
2. Dissoudre l'agent tensioactif cationique – le CTAB – (0,5 %, p/v) dans de l'eau distillée, chauffer (50°C) et homogénéiser \Rightarrow **Solution C**.
3. Ajouter 1 ml de PBS à 10 ml de la **solution A**.
4. Mélanger le tout à l'Ultra-Turrax (modèle T25 - IKA Laboratory Technology) pendant 5 min à 8000 rpm et à température ambiante dans un berlin de 20 ml.
(= *première émulsion*)
5. Ajouter 2,5 ml de cette première émulsion aux 50 ml de la **solution C** contenus dans un berlin de 100 ml.

Les étapes 6 à 14 sont semblables à celles décrites dans le protocole du point 2.5.1.

15. Ajouter 1 ml de tampon TE (Tris-Cl 1M, EDTA 0,5M, pH 7,4) contenant 1 mg de pDNAG à ~100 mg des microparticules « lavées » et mélanger.
16. Laisser incuber pendant 6 h à 4°C sous agitation continue.
17. Centrifuger à 13000 rpm pendant 10 min à 20°C (Centrifugeuse Biofuge pico Heraeus) et éliminer le surnageant.
18. Laver le culot avec 1 ml de Tampon TE.
19. Répéter l'étape 17.
20. Remettre en suspension le culot dans le volume désiré de Tampon TE.

2.5.3. Calcul des rendements d'encapsulation et d'adsorption

2.5.3.1. Dégradation des microparticules au NaOH 1M (inspiré de la ref 66)

1. Remettre en suspension dans 1 ml de NaOH 1M les microparticules lyophilisées (contenues dans une petite fiole) obtenues au point 2.5.1. ou les microparticules « lavées » obtenues au point 2.5.2..
2. Chauffer à 100°C pendant 10 min dans le bain et laisser refroidir.
3. Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 min à 20°C (Centrifugeuse Biofuge pico Heraeus) et récupérer le surnageant.

2.5.3.2. Calcul du rendement d'encapsulation et d'adsorption

Le rendement d'encapsulation ou d'adsorption (défini comme le rapport entre la quantité de pDNAG réellement encapsulé ou adsorbé et la quantité maximale de pDNAG qu'on puisse encapsuler ou adsorber) est déterminé en mesurant la DO à 260 nm du surnageant collecté à l'étape 3 du point 2.5.3.1. .

Sachant qu'une DO de 1,000 = 50 µg d'ADN / ml, on calcule la quantité d'ADN réellement encapsulé ou adsorbé grâce à la valeur obtenue.

D'autre part, connaissant les quantités de polymère et de pDNAG initiales et disposant de la valeur de DO obtenue, la charge du polymère en ADN (définie comme la quantité de pDNAG encapsulée ou adsorbée par mg de particule) peut être calculée.

2.6. Préparation de nanoparticules de Phosphate de Calcium (CaPO_4) chargées d'ADN plasmidique (pDNAG)

La technique utilisée s'inspire de celle décrite par He et al. (2000) (ref 21 et cfr page 41)

2.6.1. Encapsulation d'ADN plasmidique (pDNAG) dans des nanoparticules de Phosphate de Calcium (CaPO_4) (cfr fig. 11)

1. Mettre 7,5 ml de Chlorure de Calcium 25 mM dans un berlin de 100 ml.
2. Ajouter la quantité désirée (p.ex :500 μg) d'ADN plasmidique (pDNAG issu de l'étape 34 du point 2.3.1.) et mélanger 1 min à l'aide d'un barreau magnétique (~400t/min; VarioMag Electronicrührer Poly 15).
3. Ajouter successivement et goutte-à-goutte 1,5 ml de Citrate de Sodium 15,625 mM et 7,5 ml d'Hydrogénophosphate de Sodium 12,5 mM, tout en maintenant l'agitation.
4. Laisser 24h sous agitation à température ambiante puis soniquer la solution 1 min à 15 W (Sonicator Heat Systems – Ultrasonics, Inc.).
5. Centrifuger à 15000 g pendant 30 min à 4°C.
6. Eliminer le surnageant et laver le culot avec 5 ml de PBS 1X.
7. Répéter 1X les étapes 5 et 6.
8. Répéter l'étape 5 et éliminer le surnageant.
9. Remettre en suspension $\frac{3}{4}$ des nanoparticules dans le volume désiré de PBS 1X et conserver le tout à -20°C jusqu'à utilisation.
10. Conserver $\frac{1}{4}$ des nanoparticules pour l'évaluation du rendement d'encapsulation.

2.6.2. Adsorption d'ADN plasmidique (pDNAG) sur des nanoparticules de Phosphate de Calcium (CaPO_4) (cfr fig. 12)

1. Mettre 7,5 ml de Chlorure de Calcium 12,5 mM dans un berlin de 100ml.
2. Ajouter successivement et goutte-à-goutte 1,5 ml de Citrate de Sodium 15,625 mM et 7,5 ml d'Hydrogénophosphate de Sodium 12,5 mM, tout en mélangeant à l'aide d'un barreau magnétique (~ 400 t/min; VarioMag Electronicrührer Poly 15).
3. Laisser 24h sous agitation à température ambiante puis soniquer la solution 1 min à 15 W (Sonicator Heat Systems – Ultrasonics, Inc.).
4. Ajouter 1 ml de solution polysaccharidique (cellobiose ou mannose 292 mM) et laisser incubé o/n sous agitation lente à 4°C.
5. Ajouter la quantité désirée (p.ex. :500 μg) d'ADN plasmidique (pDNAG issu de l'étape 34 du point 2.3.1.) et laisser incubé 1h à 4°C sous agitation lente.
6. Centrifuger à 15000 g pendant 30 min à 4°C.
7. Eliminer le surnageant et laver le culot avec 5 ml de PBS 1X.
8. Répéter 1X les étapes 6 et 7.
9. Répéter l'étape 6 et éliminer le surnageant.
10. Remettre en suspension $\frac{3}{4}$ des nanoparticules dans le volume désiré de PBS 1X et conserver le tout à -20°C jusqu'à utilisation.
11. Conserver $\frac{1}{4}$ des nanoparticules pour l'évaluation du rendement d'adsorption.

2.6.3. Calcul du rendement d'encapsulation ou d'adsorption

2.6.3.1. Dégradation des nanoparticules à l'EDTA 100 mM

1. Ajouter 500 µl d'EDTA 100 mM aux nanoparticules conservées.
2. Bien vortexer jusqu'à obtention d'une solution claire.

2.6.3.2. Calcul du rendement d'encapsulation et d'adsorption

Le rendement est déterminé en mesurant la DO à 260 nm de la solution claire obtenue au point 2.6.3.1..

Sachant qu'une DO de 1,000 = 50 µg d'ADN /ml de solution, on calcule la quantité d'ADN encapsulé ou adsorbé grâce à la valeur obtenue.

2.6.4. Evaluation de la taille des nanoparticules de CaPO_4

La taille des nanoparticules de CaPO_4 a été évaluée au moyen de deux méthodes différentes.

La première méthode consiste à l'emploi d'un appareil, un Coulter Nanosizer N4M, qui exploite la *théorie de diffraction de Fraunhofer* ; quand une particule se trouve sur la trajectoire d'un faisceau laser, la lumière est déviée, soit par réflexion, soit par réfraction ou soit par diffraction (cfr fig. 13 (1) et ref. 88).

La taille des particules est calculée à partir des patterns obtenus (cfr fig. 13 (2) et ref. 88).

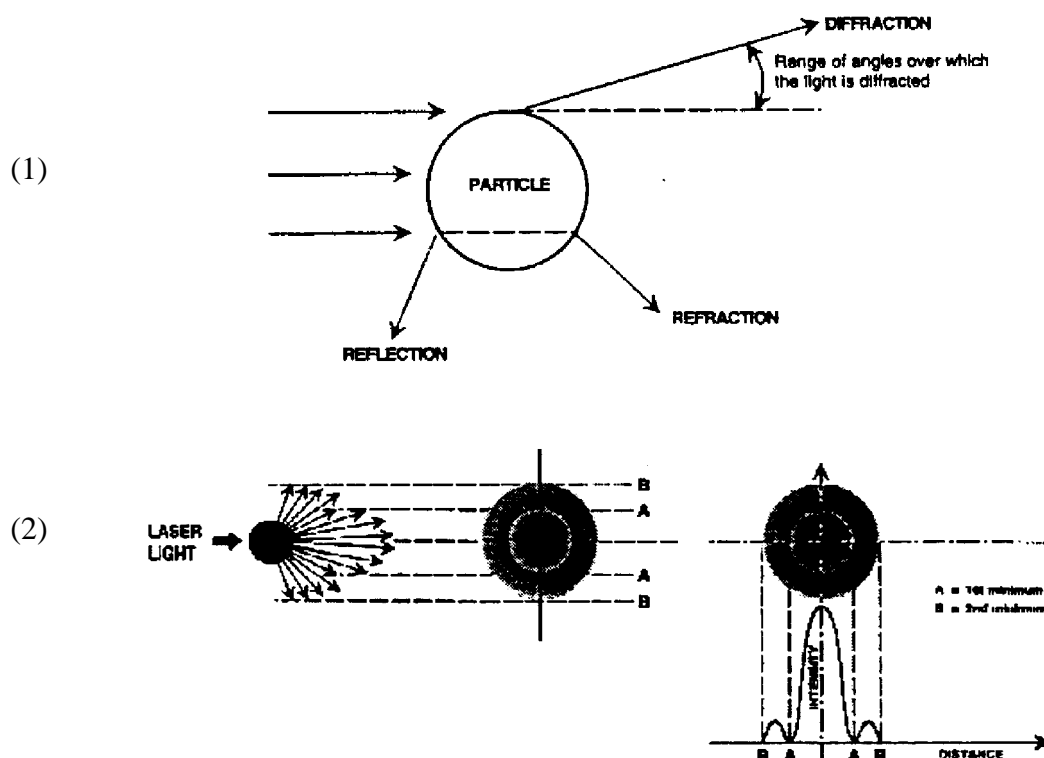


Figure 13 : Réflexion, réfraction et diffraction d'un faisceau laser dirigé sur une particule (1) et exemple de pattern obtenu pour une particule (2) (cfr ref 88)

La deuxième méthode consiste, quant à elle, à l'emploi de la *microscopie électronique à balayage* (MEB).

Une goutte de l'échantillon à observer est déposée sur un « coverslip » (lamelle en verre circulaire) qui est collé sur un support spécifique de MEB.

Ce support est alors recouvert d'une fine couche d'un mélange or-palladium afin de rendre la surface conductrice, surface qui peut alors éjecter les électrons incidents qui arrivent sur elle. Le pattern d'éjection des électrons permet d'obtenir une image en 3D. (cfr ref. 79)

2.7. Test de digestion à la DNase I

La technique s'inspire de celle décrite par Wang D. et al. (ref. 76).

Cette méthode vise à évaluer le pouvoir protecteur d'un SDV vis-à-vis de la dégradation de l'ADN par la DNase I.

1. Ajouter 1 ml d'une solution aqueuse contenant la DNase I (1mg/ml d'eau distillée, correspondant à 2000 unités) à chaque SDV testé (100 µg de pDNAG).
2. Mélanger et laisser incuber 2h sous agitation à 37°C dans un bain.
3. Dégrader les SDV selon les protocoles décrits aux points 2.5.3.1. ou 2.6.3.1., en fonction du SDV.
4. Prélever un échantillon contenant ~ 2µg de pDNAG pour chaque SDV afin de réaliser une migration électrophorétique sur un gel d'agarose 0,8% comme décrit au point 2.3.4..

2.8. Préalables à l'immunisation

2.8.1. Transfection de cellules COS

La technique utilisée est celle décrite dans la monographie LipofectamineTM Reagent de GibcoBRL. Elle doit être effectuée en conditions aseptiques et ne peut être réalisée que si le gène à exprimer possède un promoteur actif en cellules de mammifères comme les cellules COS.

1. Incuber les cellules COS (200.000 cellules/puits) contenues dans les boîtes 24 puits avec 500 µl de milieu DMEM (composition : glutamine 1% (v/v), FCS 10% (v/v)) pendant 24h à 37°C en présence de CO₂ 5%.
2. Diluer l'ADN plasmidique (pDNAG) à tester : 0, 400 ng, 500 ng ou 1 µg / 100µl de milieu sans sérum (OPTI-MEM I Reduced Serum medium, GibcoBRL) / puits.
3. Diluer les lipides cationiques (Lipofectamine®) : 1,5 ou 5 µl / 100 µl de milieu sans sérum (OPTI-MEM I Reduced Serum medium, GibcoBRL)/puits.
4. Ajouter les solutions plasmidiques préparées à l'étape 2 aux solutions lipidiques préparées à l'étape 3, mélanger doucement et laisser incuber 30 à 45 min à température ambiante afin de permettre la formation des complexes lipides cationiques/ADN.
5. Remplacer le milieu de culture des cellules COS (DMEM) par 2 ml de milieu sans sérum.
6. Mettre la suspension de complexes lipides cationiques/ADN en contact avec les cellules COS (500 µl de suspension / puits), rajouter 100 µl de milieu sans sérum à chaque puits.
7. Laisser incuber les boîtes 3-4h à 37°C en présence de CO₂ 5% puis rajouter du milieu sans sérum (500 µl/puits).
8. Replacer les boîtes dans l'incubateur à 37°C, 5% de CO₂, pour 24h.
9. Arrêter la transfection en remplaçant le milieu sans sérum par du milieu + sérum 10% (DMEM).
10. Laisser 48h dans l'incubateur à 37°C, 5% de CO₂; les cellules sont prêtes pour l'immunomarquage.

2.8.2. Immunomarquage sur cellules COS

1. 48h après la transfection (cfr point 2.8.1.), éliminer le milieu de culture DMEM, fixer les cellules pendant 3 min avec une solution aqueuse d'acétone 80% (v/v) glacé (100µl / puits) et les sécher à l'air libre.
2. Ajouter l'hydrolysate de caséine (1ml/puits) et laisser incuber pendant 2h à température ambiante afin de saturer les sites libres et éviter ainsi une adsorption aspécifique.
3. Ajouter un Ac monoclonal spécifique de la protéine recherchée (BRS20 pour la protéine G et AK13A2 pour la protéine F) sous forme de surnageant de culture (300 µl/puits).
4. Laisser incuber 1h à température ambiante afin de permettre la reconnaissance et la liaison spécifiques de l'Ac à son Ag.
5. Laver 4X avec du PBS Tween (500 µl/puits) pour ne conserver que les éventuels complexes Ag-Ac formés.
6. Ajouter un Ac de lapin anti-IgG de souris (Dako), Ac qui reconnaît le fragment Fc de tout IgG de souris. Cet Ac secondaire, qui se lie de façon spécifique aux Ac murins, est couplé à une enzyme, la peroxydase (HRP). (Ac secondaire dilué 1000X dans l'hydrolysate de caséine, 300 µl/puits)
7. Laisser incuber 1h sur table pour permettre la reconnaissance et la liaison des Ac secondaires aux Ac primaires (liés à l'Ag).
8. Laver 4X avec du PBS Tween (500 µl/puits) afin de ne conserver que le complexe Ag - Ac primaire - Ac secondaire couplé à la peroxydase.
9. Ajouter 100µl/puits d'une solution contenant un substrat chromogène de la peroxydase (le 3-amino-9-éthyl carbazole ou AEC) *et* du peroxyde d'hydrogène (Bio-X) et laisser la réaction enzymatique se faire pendant 20 min, à l'obscurité.
Le produit de dégradation coloré (rouge) permet la visualisation du marquage.
10. Arrêter la réaction enzymatique en remplaçant la mixture réactionnelle par du PBS 1X (200 µl/puits).

2.9. Immunisation parentérale de souris

Des souris femelles hybrides, âgées de 6 à 8 semaines, sont inoculées par injection intramusculaire (au niveau des pattes postérieures) et/ou par voie sous-cutanée (au niveau du dos). Les échantillons sont dilués soit dans du tampon TE pH 8,0 , soit dans du tampon PBS 1X pH 7,4. La dose administrée est 100 µg / souris sauf pour les microparticules cationiques de PLGA (50µg/souris) et le contrôle positif (Baculovirus exprimant la protéine G du BRSV, 200µg/souris).

Un prélèvement rétro-orbital est effectué avant injection et constitue le contrôle négatif préimmunitaire. Les contrôles et les rappels sont effectués 15 jours après la primo-vaccination, et ensuite, de 15 en 15 jours pendant 8 semaines.

2.10. Techniques immunologiques

2.10.1. Collecte des échantillons sanguins

Le prélèvement des échantillons sanguins se fait par ponction rétro-orbitale après avoir anesthésié les animaux par inhalation d'éther.

Après coagulation, les échantillons sont centrifugés à 3500 rpm (centrifugeuse Jouan BR4i) pendant 15 min à 4°C. Le sérum est prélevé, aliquoté de manière individuelle et un pool est réalisé à partir des séra de chaque groupe.

2.10.2. Test ELISA (cfr fig 14 et 15)

Le test ELISA, comme l'immunomarquage, associe une réaction immunologique Ag-Ac à une réaction enzymatique.

1. Diluer les échantillons à tester (séras obtenus au point 2.10.1.) de 2 en 2 à partir d'une dilution 1/100 dans le diluant (Bio-X) (cfr fig. 15).
2. Déposer 50µl de chaque échantillon dilué dans des puits pré-coatés avec le BRSV (plaque 96 puits, Pfizer).
3. Laisser incuber 1h sur table pour permettre aux Ac spécifiques éventuellement présents dans les séras murins de reconnaître et de se lier aux Ag viraux fixés.
4. Laver 4X avec du PBS Tween (300 µl/puits ; Labsystems Multidrop) afin d'éliminer tout ce qui n'est pas attaché de façon spécifique au BRSV.
5. Ajouter 50 µl/puits d'Ac monoclonal de lapin anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (HRP) préalablement dilué 2000X (Dako, cfr point 2.8.2.).
6. Laisser incuber 1h sur table pour permettre la reconnaissance et la liaison des Ac secondaires aux Ac primaires (liés à l'Ag).
7. Laver 4X avec du PBS Tween (300 µl/puits ; Labsystems Multidrop) afin de ne conserver que le complexe Ag - Ac primaire - Ac secondaire couplé à la peroxydase.
8. Ajouter 100 µl/puits d'une solution contenant un substrat chromogène de la peroxydase (le tétraméthylbenzidine ou TMB) *et* du peroxyde d'hydrogène (Bio-X) et laisser la réaction enzymatique se faire pendant 20 min, à l'obscurité.
Le produit de la réaction enzymatique colore en bleu le contenu du puits. L'intensité du bleu est fonction de la quantité de substrat transformé, elle-même fonction de la quantité d'enzyme couplée à l'Ac secondaire, elle-même fonction de la quantité d'Ac reconnaissant spécifiquement le BRSV.
9. Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant de l'acide orthophosphorique 1M (50 µl/puits). L'acide modifie la couleur du liquide qui vire au jaune.
10. Lire l'absorbance à 450 nm (EL 340 BioTek Instruments).

Résultats et Discussion :

3.1. Préparation du plasmide contenant le gène codant pour la protéine G du BRSV (pDNAG)

Afin de tester différentes formes vaccinales, il était nécessaire de produire une grande quantité de plasmide contenant le gène codant pour la protéine G du BRSV (pDNAG). A cette fin, le pDNAG fourni par le Dr Keil a été, après amplification, utilisé comme matériel de départ.

Ce pDNAG, d'une taille de 5596 bp, présente un promoteur fort dérivé du CMV et une séquence de polyadénylation induisant une expression optimale dans les cellules de mammifères. Il possède également une origine de répllication (ORI) qui va permettre sa répllication dans des bactéries. Il est enfin porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline afin de permettre la sélection des bactéries transformées avec celui-ci (cfr point 1.4. de la partie « Introduction » page 9).

3.1.1. Préparation de bactéries compétentes et transformation de ces bactéries

Première étape préalable à toute « production à grande échelle » : le choix de la « bonne » souche bactérienne, c.-à-d. de la souche qui permettra, in fine, d'**obtenir la quantité maximale de plasmide** purifié, pour y introduire le pDNAG.

A cette fin, **4 souches** différentes d'**E. coli** ont été testées :

DH10B (génotype : F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara,leu*)7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG*)

DH5 α (génotype : F⁻ ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(r_K^- , m_K^+) *gal^-* *phoA* *supE44* λ^- *thi-1* *gyrA96* *relA1*)

MC1061 (génotype : F⁻ *hsdR* *mcrB* *araD139* Δ (*araABC-leu*)7679 Δ *lacI74* *galU* *galK* *strA* *thi*)

Tg1 (génotype : *supE* *thi-1* Δ (*lac-proAB*) Δ (*mcrB-hsdSM*)5 (r_K^- , m_K^-) [F' *traD36* *proAB* *lacIqZ* Δ M15]).

Chaque souche a été rendue « compétente » comme décrit au point 2.1. de la partie « Matériels et Méthodes » (page 18) puis transformée avec le plasmide pDNAG comme décrit au point 2.2. de la partie « Matériels et Méthodes » (page 18).

Le but de la « compétence » est de « préparer » les bactéries au choc thermique qu'elles vont subir lors de l'introduction du pDNAG (processus de transformation). Cette introduction s'obtient via une déstabilisation membranaire brève et locale.

Les transformants ont été sélectionnés positivement via une culture en milieu contenant de l'ampicilline ; seules les bactéries possédant le plasmide porteur du gène de résistance à l'ampicilline ont été capables de pousser sur ce milieu.

Des transformants positifs ont été obtenus avec chacune des 4 souches.

Pour chacune d'elles, une Miniprep suivie d'une restriction enzymatique a été réalisée afin de vérifier la présence du pDNAG dans ces transformants positifs.

3.1.2. MiniPrep et Restriction enzymatique

3.1.2.1. Purification

Le protocole du kit Qiagen (Qiagen Mini Plasmid Purification) a été appliqué afin d'amplifier et de purifier le pDNAG.

Lors de l'étape de préculture (cfr étape 1 du protocole de purification décrit au point 2.3.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 19), le **comportement des différentes souches** retenues n'a **pas** été **identique**. En effet, après les 8 h d'incubation à 37°C, le milieu dans lequel a été ajoutée la colonie bactérienne doit apparaître trouble (expression de la prolifération bactérienne) (cfr fig. 16). Les souches **DH10B** et **DH5α** n'ont pas présenté ce « signe de prolifération » une fois ce laps de temps écoulé.

Ces souches ont dès lors été écartées.

Pour la suite, **seules les souches Tg1 et MC1061 ont été utilisées**.

3.1.2.2. Restriction enzymatique

Le pDNAG ainsi purifié est coupé par deux enzymes de restriction (*Hind* III et *Nhe* I) choisies en fonction de la carte du plasmide pDNAG (les **deux enzymes** ne coupent chacune le plasmide qu'en un seul et unique endroit, cfr fig. 17).

La taille initiale du pDNAG est de **5596 bp** ; celle des deux fragments générés par la restriction enzymatique est de **4365** et **1231 bp** (cfr fig. 17).

$$5596 - 1231 = 4365 \text{ bp}$$

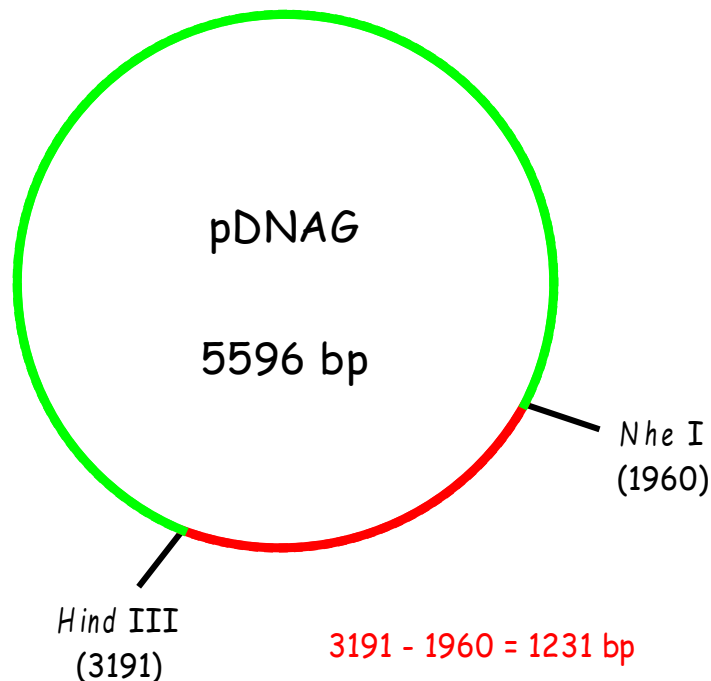


Figure 17: Carte du pDNAG représentant la localisation du site de restriction unique de *Hind* III et de *Nhe* I. A partir des sites, on peut calculer la taille des fragments générés par la restriction enzymatique.

L'échantillon qui a subi la restriction enzymatique ainsi que l'échantillon natif ont, tous deux, été soumis à une migration électrophorétique en gel d'agarose 0,8% (selon le protocole décrit au point 2.4. de la partie « Matériels et Méthodes » page 21) pour permettre leur visualisation.

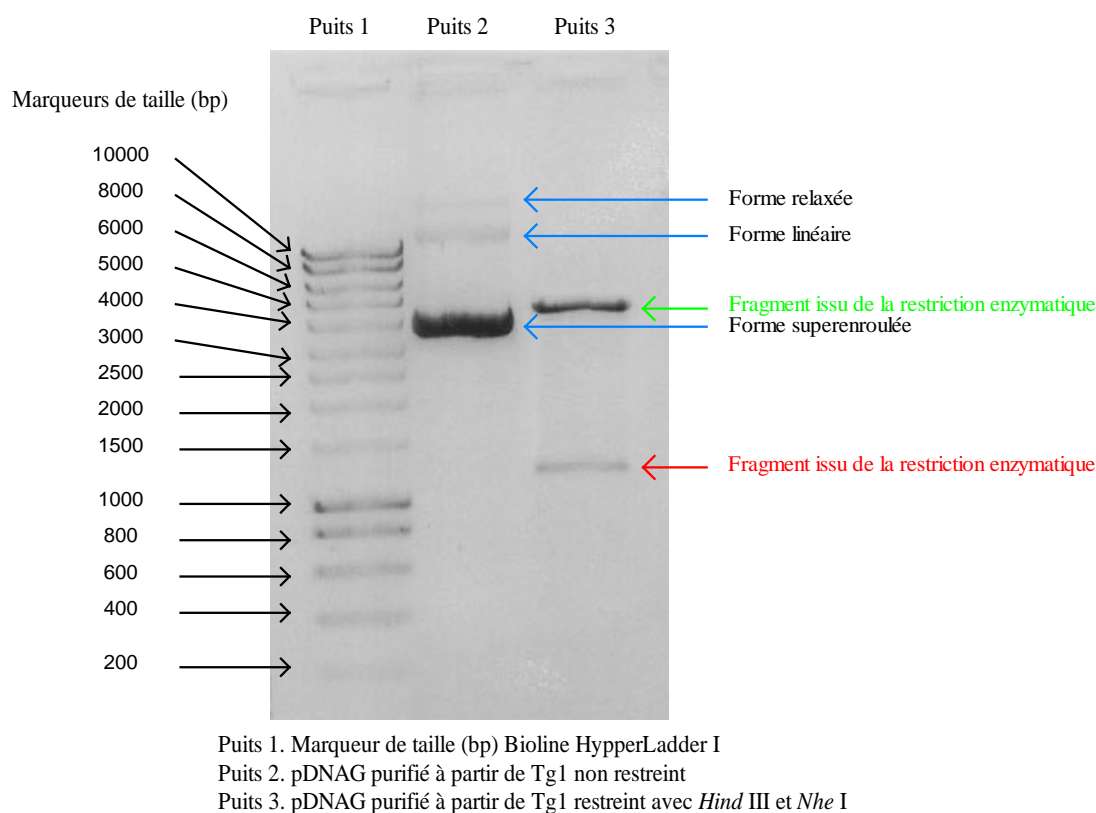


Figure 18: Pattern électrophorétique sur gel d'agarose 0,8% du pDNAG obtenu à partir d'une culture de cellules Tg1 transformées avec ce plasmide, restreint ou non avec *Hind* III et *Nhe* I

L'examen du gel réalisé pour la souche **Tg1** et présenté dans la figure 18 révèle le profil caractéristique des plasmides non restreints (puits 2). En haut, la forme relaxée (open circular form), en bas la forme superenroulée (supercoiled circular form) et, entre les deux, la forme linéaire.

La différence d'intensité observée entre les différentes bandes permet d'affirmer que la forme superenroulée est la plus abondante. Certains auteurs ont montré que l'isoforme superenroulée semble la meilleure pour une vaccination au moyen d'un vaccin ADN (ref. 43).

Le puits 3 du gel réfère à l'échantillon qui a subi la restriction enzymatique. Le tracé met en évidence deux bandes bien visibles ; leur taille peut être évaluée grâce au marqueur de taille présent dans le puits 1. Ainsi, la bande du haut a une taille comprise **entre 4000 et 5000 bp** et celle du bas **entre 1000 et 1500 bp**. Les fragments obtenus par restriction enzymatique avec *Hind* III et *Nhe* I correspondent donc bien aux fragments attendus (4365 et 1231 bp).

En conclusion, le plasmide produit est bien celui attendu.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec la souche **MC1061**.

Le plasmide produit étant celui attendu, la seconde phase du travail a été de produire et de purifier, via une Gigaprep, une grande quantité de pDNAG.

3.1.3. GigaPrep et Restriction enzymatique

Des GigaPrep ont donc été réalisées avec les deux souches retenues, **Tg1** et **MC1061** afin de quantifier la quantité de pDNAG produite par chacune d'elles.

3.1.3.1. Purification (point 2.3. de la partie « Matériels et Méthodes » page 19)

Des modifications ont été apportées au protocole initial (Qiagen Giga Endofree Plasmid Purification, manuel 12/2002) en vue d'améliorer la quantité de plasmide purifié récolté (cfr point 3.1.3.1. B).

A. Analyse du gel d'agarose

2µl de chaque échantillon prélevé à chaque étape de la purification (cfr point 2.3.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 19) ont été déposés sur un gel d'agarose 0,8% (cfr point 2.3.4. de la partie « Matériels et Méthodes » page 21).

Dans le cadre de la purification, ce gel sert à :

1. Quantifier l'ADN purifié aux différentes étapes d'élution

Même sans densitomètre permettant de faire une analyse quantitative, il est possible de comparer les échantillons entre eux afin d'avoir une idée à la fois qualitative et semi-quantitative de la « réussite » de la purification. En effet, la **variation observée dans l'épaisseur des bandes** correspond, de façon approximative, à la quantité d'ADN purifié retrouvé aux différentes étapes d'élution, quantité évaluée, in fine, par spectrophotométrie (cfr point 3.1.3.1. B).

2. Identifier, en cas de problème quantitatif ou qualitatif, l'étape de purification où le problème s'est produit.

a. L'échantillon prélevé après passage du lysat sur le filtre *Qiafilter Cartridge* (puits 2) nous permet de **savoir si les conditions de lyse étaient optimales**.

Sur le gel (fig. 19), les bandes correspondent d'une part au profil caractéristique des plasmides (cfr point 3.1.2.2. ci-dessus) et d'autre part au plasmide contrôle (puits 15).

Il semble donc que les conditions de lyse aient été bonnes.

b. L'échantillon prélevé après passage du filtrat sur la colonne *Qiagen Tip-10000* (puits 3 et 5) permet de **savoir si l'ADN s'est bien accroché** à celle-ci.

La purification du plasmide est basée sur l'interaction entre les charges négatives de l'ADN et les charges positives du DEAE (DiEthylAminoEthanol) de la colonne *Qiagen Tip-10000* comme le montre la fig. 20.

L'absence de bandes observée dans les puits 3 et 5 nous prouve que l'ADN s'est bien accroché à la colonne.

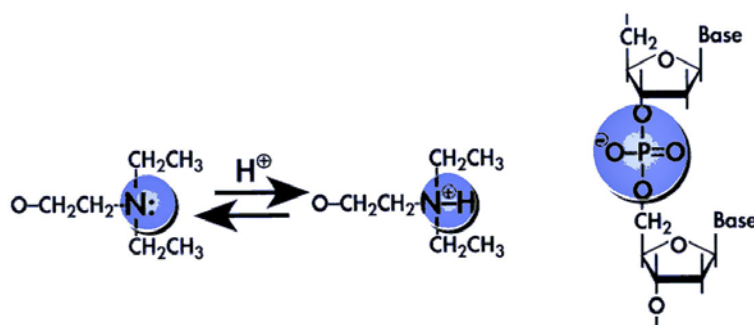


Figure 20: Interaction entre le groupement amine du DEAE de la colonne échangeuse d'anion (à gauche) et le groupement phosphate de l'ADN (à droite) (cfr ref. 57)

c. L'échantillon prélevé après lavage de la colonne *Qiagen Tip-10000* avec le tampon QC (puits 4 et 6) permet de **vérifier que l'ADN est toujours accroché à la colonne**.

Le but de ce lavage est d'éliminer **sans décrocher l'ADN** tout contaminant qui pourrait subsister et contaminer ultérieurement l'éluat (p.ex. : ARN).

La fig. 21 montre comment la purification de l'ADN plasmidique est possible grâce à la modulation de la concentration en NaCl. L'ADN plasmidique peut rester lié au DEAE sur une large gamme de concentrations en NaCl. Les impuretés telles l'ARN ou les protéines sont éliminées de la colonne avec des tampons de faible concentration en NaCl. L'ADN plasmidique reste, quant à lui, accroché à la colonne jusqu'à son élution avec un tampon de concentration en NaCl plus élevée.

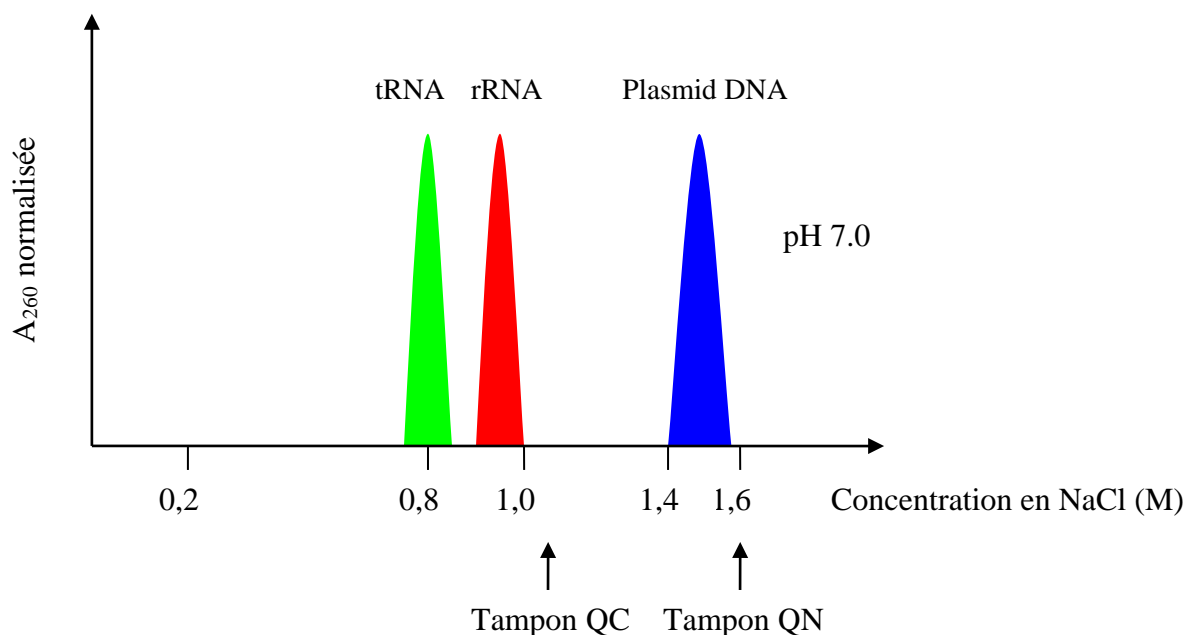


Figure 21: Séparation des acides nucléiques à pH neutre (7.0) sur la colonne Qiagen échangeuse d'anion (cfr ref 57)

Comme pour le point précédent, aucune bande ne peut être observée dans les puits 4 et 6 ; l'ADN est donc toujours bien accroché à la colonne.

d. Les échantillons prélevés après élution tant avec le tampon QN qu'avec l'eau (puits 7, 9, 11 et 13) attestent que ***l'ADN s'est bien décroché de la colonne*** (cfr fig. 19).

Le profil caractéristique des plasmides y est reproduit. Dans les 4 puits cités, le profil est semblable à celui observé dans le puits 15 pour le plasmide contrôle.

Le résultat observé semble correspondre au plasmide attendu.

Une restriction enzymatique (cfr point 3.1.3.2.) va permettre de s'en assurer.

B. Détermination de la quantité et du degré de purification de l'ADN purifié

Ne pouvant pas faire d'analyse quantitative à partir du gel d'agarose, l'alternative a été d'utiliser la spectrophotométrie pour quantifier l'ADN purifié ainsi que pour déterminer la pureté de la préparation (cfr points 2.3.2 et 2.3.3. de la partie « Matériels et Méthodes » page 20)

Par cette méthode, la quantité d'ADN plasmidique purifié est de :

11,08 mg pour la purification faite avec la souche **MC1061** et

22,68 mg pour la purification faite avec la souche **Tg1**.

Au niveau du « **rendement** » **obtenu**, une différence allant du simple au **double** peut être mise en évidence entre les deux souches.

De plus, les modifications apportées au protocole initial de Qiagen ont également initié une différence de « rendement », allant également, pour **Tg1**, du simple au double.

Les modifications en question sont d'une part, l'étape d'élution avec l'eau distillée, succédant à l'élution avec le tampon d'élution du kit Qiagen, et d'autre part, une réutilisation du liquide passé sur la colonne Qiagen avant l'ajout du tampon QC (cfr point 2.3.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 19).

Ces modifications ont indiscutablement amélioré le rendement obtenu eu égard au protocole initial.

Conclusion : Tg1 étant incontestablement la souche qui donne le plus de pDNAG purifié, seule celle-ci a été conservée.

En ce qui concerne le degré de purification de l'ADN plasmidique, la valeur calculée est de **1,89** de moyenne, ce qui représente un **bon degré de purification**.

3.1.3.2. Restriction enzymatique

Comme pour la Miniprep (point 3.1.2.2.), une restriction enzymatique est effectuée afin de vérifier si l'ADN plasmidique purifié aux différentes étapes est bien celui attendu.

Pour cette étape de validation, une seule enzyme de restriction sera utilisée : *Hind III*. En conséquence, seul peut être obtenu le fragment correspondant à une taille de **5596 bp** (cfr fig 17).

La comparaison des bandes observées dans les puits 8, 10, 12 et 14 avec le standard de taille (fig. 19) montre que la restriction enzymatique a généré, pour tous les échantillons restreints, un seul fragment d'une taille se situant **entre 5000 et 6000 bp**. Ce fragment obtenu correspond donc bien à ce qui est attendu. C'est donc le bon plasmide.

3.2. Préparation des systèmes de délivrance de vaccins (SDV)

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction (cfr point 1.4. page 10), l'ADN plasmidique a un potentiel vaccinal qui peut (et doit) être amélioré. Des SDV ont été élaborés à cette fin. Ces SDV ont fait et font encore aujourd'hui l'objet de nombreuses études visant à leur optimisation (cfr ref. 28, 29 et 67).

Parmi les différents SDV qui existent à ce jour, le choix s'est porté, dans un premier temps, sur le PLGA.

3.2.1. PLGA

Ce copolymère **biodégradable** et **biocompatible** est un des rares à avoir été agréé par la Food and Drug Administration (FDA) pour l'usage humain et animal.

Le PLGA a été d'abord utilisé comme fil de suture vu son caractère biodégradable et biocompatible. Ensuite, il a été exploité comme véhicule permettant une libération contrôlée de substances pharmaceutiques. Enfin, il a été exploité comme SDV car il permet non seulement une **libération lente et contrôlée** du matériau vaccinal, mais également la **capture par les APC** (pour les particules dont la taille est inférieure à 10 µm) et la **capture par les tissus lymphoïdes**, tout en assurant la **protection du matériau encapsulé** (cfr ref 15).

De plus, des études ont démontré que des particules de PLGA, chargées de molécules immunogènes, sont capables d'**induire une réponse immunitaire tant humorale que cellulaire et tant systémique que mucoale** (ref. 12, 46 et 51).

Toutes ces propriétés font donc du PLGA un SDV de choix pour notre étude.

3.2.1.1. Structure chimique du PLGA

Le PLGA est un polyester composé de monomères d'acides lactique et d'acide glycolique comme le montre la fig 22 (1).

3.2.1.2. Dégradation du PLGA (cfr fig. 22 (2))

Le PLGA est dégradé par hydrolyse des liaisons esters. Les produits de dégradation sont l'acide lactique et l'acide glycolique.

L'acide lactique et l'acide glycolique entrent dans le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs), ils y sont métabolisés et ensuite éliminés sous forme de CO₂ et d'H₂O.

Différents facteurs peuvent influencer cette dégradation hydrolytique. Parmi ceux-ci :

1. la composition chimique (ratio acide lactique : acide glycolique)
2. le caractère ± hydrophile selon le ratio acide lactique : acide glycolique
3. le PM
4. les dimensions des particules
5. la porosité (cfr ref. 3).

3.2.1.3. Préparation des microparticules de PLGA

La méthode de la double émulsion a été choisie car elle permet d'encapsuler des molécules hydrosolubles comme l'ADN. (ref 28)

Chacun des paramètres du procédé est important, il module les propriétés pharmacocinétiques des microparticules formées.

A titre d'exemple :

- La vitesse d'homogénéisation influence la taille des particules formées.
- Le type de solvant organique influence le rendement d'encapsulation.
- Le volume de phase organique influence la taille des particules formées.
- La concentration en polymère influence le rendement d'encapsulation et le taux de dégradation. (ref 50)

Il est donc important de bien sélectionner ces paramètres en fonction de l'objectif à atteindre.

A. Encapsulation du pDNAG dans des microparticules de PLGA

Les particules de PLGA, produites selon la technique de double émulsion décrite au point 2.5.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 22, n'ont été évaluées que pour deux aspects : le rendement d'encapsulation et la charge du polymère.

Les autres paramètres – à savoir l'analyse morphologique et la détermination de la taille de particules de PLGA – n'ont pas été étudiés dans le cadre de ce mémoire ; ils ont déjà fait l'objet d'une autre étude (ref 58). L'analyse, par microscopie électronique, de ces particules (produites selon le même protocole que celui appliqué ici) a montré qu'elles sont sphériques, lisses, bien individualisées et de taille relativement homogène (~10µm).

Le **diamètre** de ces particules, déterminé sur base de trois échantillons indépendants, a été évalué à **9,94µm ± 0,71** au moyen d'un Coulter Multisizer. Le principe de cet appareil repose sur la modification, lors du passage des particules, d'un champ électrique établi entre deux électrodes. L'appareil utilisé pour évaluer la taille des nanoparticules de CaPO₄ repose, quant à lui, sur la modification de la trajectoire d'un faisceau laser lors du passage des particules (cfr point 2.6.4. de la partie « Matériels et Méthodes »).

Le rendement d'encapsulation et la charge du polymère ont été évalués grâce à la dégradation des particules (cfr point 2.5.3.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 23) qui a permis la libération du pDNAG encapsulé (cfr point 2.5.3.2. de la partie « Matériels et Méthodes » page 23)

Le rendement d'encapsulation représente le rapport de la quantité de pDNAG réellement encapsulée sur la quantité maximale de pDNAG qu'on puisse encapsuler, x 100.

La charge du polymère en pDNAG représente, quant à elle, la quantité de pDNAG encapsulée par mg de particule, x 100.

$\text{Rendement d'encapsulation} = \left(\frac{\text{Quantité de pDNAG réellement encapsulée}}{\text{Quantité maximale de pDNAG qu'on puisse encapsuler}} \right) \times 100$
$\text{Charge du polymère en pDNAG} = \left(\frac{\text{Quantité de pDNAG réellement encapsulée}}{\text{Quantité de polymère (nombre de mg)}} \right) \times 100$

La manipulation a été répétée à trois reprises ; les **rendements d'encapsulation** obtenus sont les suivants : 16,5% ; 65,4% et 77,6%. **et les charges de polymère en pDNAG** : 0,066% ; 1,048% et 0,623%.

Ces résultats, **très variables**, semblent montrer que la méthode utilisée pour l'encapsulation du pDNAG dans les microparticules de PLGA n'est pas très « reproductible ».

Il est cependant important de noter que les conditions opératoires ne sont pas tout à fait identiques, d'où le terme « reproductible » mis entre guillemets. En effet, des rendements de 16,5% et 77,6% ont été obtenus pour 1mg de pDNAG encapsulé dans les particules de PLGA et de 65,4% pour 2 mg de pDNAG encapsulé dans les particules de PLGA.

La quantité de pDNAG initiale influence sans doute le rendement d'encapsulation (ref 58). Néanmoins, un problème subsiste car, pour une même quantité initiale de pDNAG, on observe des résultats nettement différents.

En ce qui concerne la charge du polymère, elle semble, quant à elle, en relation avec la quantité initiale de pDNAG et le rendement d'encapsulation obtenu :

- 0,066% pour un rendement d'encapsulation de 16,5% avec une quantité initiale de pDNAG de 1mg
- 0,623% pour un rendement d'encapsulation de 77,6% avec une quantité initiale de pDNAG de 1mg
- 1,048% pour un rendement d'encapsulation de 65,4% avec une quantité initiale de pDNAG de 2mg

Il serait donc intéressant de refaire l'expérience, dans des conditions identiques, et de vérifier, par un test statistique, si les résultats obtenus sont significativement différents ou non.

Au regard de la littérature, il semble cependant que le rendement d'encapsulation le plus faible soit celui qui soit le plus vraisemblable (cfr ref. 4 et 28).

En effet, l'équipe d'Ando S. (ref 4) a montré que l'encapsulation d'ADN plasmidique dans des microparticules de PLGA par la méthode de double émulsion présentait **trois inconvénients** assez importants :

1. le **rendement d'encapsulation** est **faible** (~20%)
2. la **technique de fabrication** des microparticules provoque une **dégradation de l'isoforme plasmidique superenroulée**
3. la **lyophilisation** des microparticules provoque également une **dégradation de l'isoforme plasmidique superenroulée**.

Le protocole opératoire utilisé a rencontré les trois inconvénients sus-mentionnés.

La dégradation de l'isoforme superenroulée a été confirmée en faisant migrer, sur un gel d'agarose 0,8%, le pDNAG extrait après dégradation au NaOH (cfr point 2.5.3.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 23). La figure 23 montre les différentes isoformes plasmidiques. Le puits 2 correspond au pDNAG extrait des microparticules, le puits 3, au pDNAG non encapsulé.

Une différence de ratio entre les différentes isoformes est observée. Le puits 2 montre que **l'isoforme superenroulée n'est plus l'isoforme majoritaire** contrairement à ce qui est observé dans le puits 3. C'est l'isoforme linéaire qui semble la plus abondante dans le puits 2.

Pour échapper aux « inconvénients » rappelés ci-dessus, une technique d'adsorption du pDNAG sur des microparticules cationiques de PLGA est testée.

B. Adsorption du pDNAG sur des microparticules cationiques de PLGA

Singh M. et al. ont montré que cette méthode présente un avantage appréciable par rapport à l'encapsulation. En effet, les microparticules sont produites dans un premier temps et ensuite, dans un second, mises au contact de l'ADN plasmidique, *évitant ainsi à l'ADN le processus agressif d'encapsulation* (cfr ref 66).

Cette façon de procéder permet de maintenir une *charge globale positive* du système microparticule-ADN (c.-à-d. que la charge ionique de chacun des constituants du système est additionnée pour donner la charge globale du système) grâce à l'agent ionique – le CTAB –, favorisant ainsi une *interaction du système avec la membrane cellulaire* qui elle, a une charge globalement négative. (ref 15)

La technique décrite par Singh M. et al. a donc été appliquée. Comme pour l'encapsulation, le rendement d'adsorption et la charge du polymère en pDNAG ont été calculés, sur base des quantités initiales et finales de pDNAG et de PLGA, en appliquant les formules suivantes :

$\text{Rendement d'adsorption} = (\text{Quantité de pDNAG réellement adsorbée} / \text{Quantité maximale de pDNAG qu'on puisse adsorber}) \times 100$
$\text{Charge du polymère en pDNAG} = (\text{Quantité de pDNAG réellement adsorbée} / \text{Quantité de polymère (nombre de mg)}) \times 100$

Trois lavages des microparticules ont été effectués lors des premières expériences (cfr étapes 10 à 14 du point 2.5.1. de la partie « Matériels et Méthodes » page 22). Ils ont eu pour conséquence un *rendement d'adsorption de 10% et une charge du polymère en pDNAG de 0,020%*.

Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par les auteurs (ref 66). Cependant, dans un article paru en 2003, ils ont montré que plus on effectue de lavages des microparticules, plus on diminue la quantité de CTAB résiduelle et les charges positives qui y sont liées (ref 67).

A la lumière de cette dernière publication, les lavages ont été ramenés à *deux*, tout en maintenant la concentration en CTAB (à savoir 0,5%). Le *rendement d'adsorption* s'est quelque peu amélioré: *17 %* de moyenne (n=2) de même que la *charge du polymère en pDNAG : 0,085%*.

Par ailleurs, dans ce même article, les auteurs ont également montré que plus la concentration en CTAB augmente, plus le rendement d'adsorption est élevé.

Malheureusement, tout comme pour les lipides cationiques, une charge positive trop élevée (liée à une concentration en CTAB trop élevée) peut s'avérer toxique pour les cellules...

Qu'en est-il de la dégradation de l'isoforme superenroulée ?

Comme dans le cas de l'encapsulation, les microparticules ont été dégradées au NaOH et le pDNAG extrait soumis à une migration électrophorétique. La figure 24 confirme les dires de Singh M. et al. ; le pDNAG « dissocié » des microparticules de PLGA, dans le puits 2, présente un profil semblable au pDNAG non adsorbé présent dans le puits 3 (la traînée observée est due à la quantité de pDNAG déposée dans ce puits, quantité plus élevée que celle déposée dans le puits 2).

Dans les deux cas, l'isoforme superenroulée semble être l'isoforme majoritaire. La *technique permet donc bien de prévenir la dégradation de l'isoforme plasmidique superenroulée*.

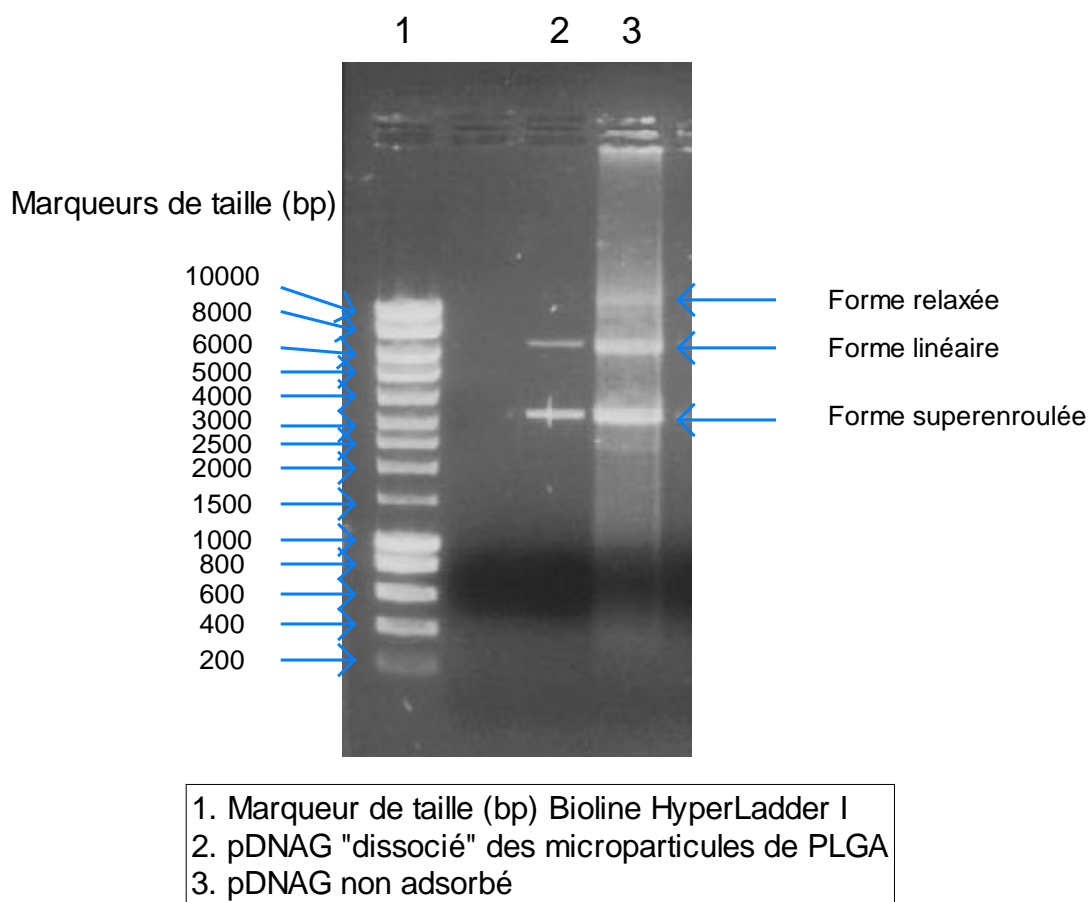


Figure 24: Pattern électrophorétique sur gel d'agarose 0,8% du pDNAG "dissocié" des microparticules de PLGA

D'autres caractéristiques ont également été étudiées. Ainsi, l'analyse, au moyen du MEB, des microparticules cationiques de PLGA a montré un mélange très hétérogène. D'un côté, des particules sphériques, lisses, individualisées et d'une taille comprise entre 1 et 10 μm , de l'autre, des particules très poreuses, de taille difforme subissant une « *hyperaggrégation* ». (cfr fig. 25)

Cette « hyperaggrégation », visible à l'œil nu, *empêche toute immunisation par voie autre que sous-cutanée* (cfr point 3.3.2. de la partie « Résultats et Discussion »).

Cet *inconvenient majeur* nous a poussés à chercher un autre SDV : les nanoparticules de CaPO_4 .

3.2.2. Nanoparticules de CaPO₄

He Q. et al. ont mis au point une technique pour préparer des nanoparticules de CaPO₄. Ils ont évalué le potentiel adjuvant du CaPO₄ dans le cadre d'une vaccination contre le Virus Herpès Simplex -2 (HSV-2) (cfr ref 20 et 21).

Les résultats qu'ils ont obtenus ont montré que ces nanoparticules de CaPO₄ présentaient des avantages très intéressants pour une vaccination anti-virale :

- elles n'induisent que ***peu de réponse inflammatoire au site d'administration*** (induction d'une ***réponse IgE insignifiante***)
- elles conduisent à la production de ***hauts titres d'anticorps neutralisants et d'IgG2a*** (Ac qui confère une protection anti-virale (cfr ref 10), la production d'IgG2a étant généralement reconnue comme synonyme d'une réponse Th1)
- elles stimulent une ***réponse immunitaire cellulaire*** (dont des réponses impliquant des lymphocytes T cytotoxiques).
- elles sont capables d'induire une ***immunité mucoale***.
- elles permettent de ***protéger*** le sujet immunisé par voie mucoale ***contre une infection post-vaccinale***.
- elles permettent une ***libération à long terme*** du matériau vaccinal.
- elles ont un diamètre inférieur à 10µm et peuvent donc être facilement ***capturées par les APC***.
- elles sont ***biodégradables***.
- elles sont ***faciles à fabriquer*** aussi bien à petite qu'à grande échelle.
- elles semblent être ***assez stables***.

Ces nanoparticules de CaPO₄ disposent donc, a priori, de caractéristiques favorables à un bon SDV pour une vaccination BRSV !

Il faut cependant noter que la publication portait sur un vaccin de type sous-unitaire et non un vaccin plasmidique.

Le protocole initial a donc été modifié pour être adapté au vaccin plasmidique.

3.2.2.1. Préparation des nanoparticules de CaPO₄

L'adsorption d'une protéine immunogène sur des nanoparticules de CaPO₄ préalablement enrobées d'un sucre, le cellobiose, qui joue le rôle d'agent fixateur, nécessite 11 jours de préparation selon le schéma suivant :

- 2 jours d'agitation,
- 7 jours de stabilisation des particules,
- 1 nuit d'incubation des particules avec le cellobiose et
- 1 jour pour l'adsorption de la protéine et les lavages. (cfr ref. 20)

Les schémas représentés à la figure 26 montrent les modifications effectuées vis-à-vis du protocole initial :

- A) La protéine immunogène a été remplacée par le pDNAG, le pDNAG constituant le matériau vaccinal.
- B) Afin d'accroître la protection du matériau vaccinal, une encapsulation a été réalisée.
- C) Comme la raison d'être du cellobiose est de « coller » le matériau vaccinal aux nanoparticules, un autre sucre, le mannose, lui a été préféré. En effet, outre sa capacité d'agent fixateur, le mannose dispose de la possibilité de se lier à des récepteurs spécifiques au niveau des APC, cellules cibles du processus vaccinal.
- D) Dans cette optique, les nanoparticules dans lesquelles le pDNAG a été préalablement encapsulé ont subi un enrobage au mannose.

Ces différentes formulations ont été comparées au niveau du rendement (d'encapsulation ou d'adsorption), et pour différentes quantités de pDNAG. Le rendement a été calculé comme décrit au point 2.6.3. de la partie « Matériels et Méthodes » page 25, selon la même formule que celle donnée au point 3.2.1.3.A ou B.

Seul ¼ des nanoparticules a été dégradé pour calculer le rendement et ce, afin de conserver le maximum de nanoparticules en vue d'une immunisation.

Le tableau 2 et la figure 27 reprennent les différentes formulations testées.

Le **rendement d'adsorption du pDNAG** n'est pas très élevé, **entre 10 et 20 %**, sauf pour l'adsorption de 200 µg de pDNAG à enrobage de mannose (38%). Il faut cependant être prudent car cette valeur n'a été calculée qu'à partir d'un échantillon. Il faudrait donc refaire cette manipulation au moins trois fois pour disposer d'une valeur plus représentative.

Le *type de sucre* utilisé pour l'enrobage semble modifier quelque peu la valeur du rendement. Par contre, la *quantité de pDNAG initiale* ne semble pas influencer de façon flagrante le rendement d'adsorption.

Un test statistique devrait permettre de déterminer si la quantité de pDNAG initiale et le type de sucre utilisé pour l'enrobage influencent ou non de façon significative le rendement d'adsorption.

Le **rendement d'encapsulation du pDNAG** est quant à lui **très élevé : entre 70 et 90%**. Il semble qu'il y ait une différence non seulement vis-à-vis de la *quantité de pDNAG initiale*, mais également vis-à-vis de la *présence ou non d'un enrobage* et du *type de sucre* utilisé pour cet enrobage.

Comme plus haut, un test statistique va permettre de déterminer si cette différence est significative ou non.

3.2.2.2. Autres caractéristiques des nanoparticules de CaPO₄

L'analyse, en microscopie électronique, fait apparaître des particules curieusement assez cubiques, de taille et de forme relativement hétérogènes. On peut cependant estimer que les particules de CaPO₄ ont une taille comprise entre 1 et 5 µm (cfr fig. 28).

L'évaluation de leur taille, au moyen d'un Coulter N4M, comme décrit au point 2.6.4 de la partie « Matériels et Méthodes » page 25, estime le diamètre moyen à 1250 nm, soit un peu plus d'un µm.

Ces données sont comparables à celles obtenues par He et ses collaborateurs (cfr ref 19).

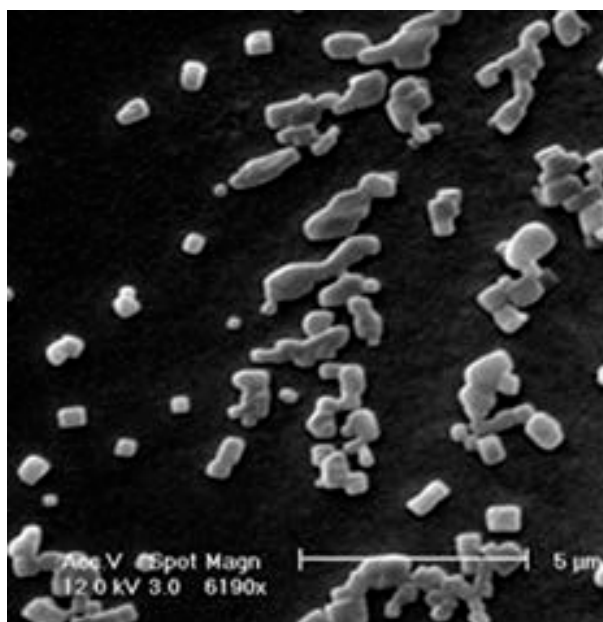


Figure 28: Photographie de microscopie électronique à balayage de nanoparticules de CaPO₄ obtenues selon les conditions décrites au point 2.6.1. de la partie « Matériels et Méthodes »

3.2.2.3. Questions résolues

A. La concentration en CaCl_2 influence-t-elle le rendement ?

Une des différences les plus frappantes est celle observée entre le rendement obtenu en adsorption et celui obtenu en encapsulation (cfr fig. 27 et tableau 2).

Or, la seule grande différence est la concentration en CaCl_2 utilisée (cfr points 2.6.1. et 2.6.2. de la partie « Matériels et Méthodes » page 24). Pour l'encapsulation, nous avons utilisé du CaCl_2 25 mM et pour l'adsorption, nous avons utilisé du CaCl_2 12,5 mM.

Pour vérifier si la concentration en CaCl_2 influence le rendement, nous avons réalisé deux tests :

- Une **encapsulation de 1000 μg de pDNAG** avec une solution de **CaCl_2 12,5 mM**, réalisée dans les mêmes conditions que l'encapsulation de 1000 μg de pDNAG avec une solution de CaCl_2 de 25 mM.
- Une **adsorption de 1000 μg de pDNAG** avec un enrobage de mannose (292mM) et avec une solution de **CaCl_2 de 25 mM**, réalisée dans les mêmes conditions que l'adsorption de 1000 μg de pDNAG avec un enrobage de mannose (292mM) et avec une solution de CaCl_2 12,5 mM.

Le **rendement d'adsorption** est de **65,8%** et le **rendement d'encapsulation** est de **15,7%**.

Le rendement d'adsorption se rapproche donc des valeurs obtenues pour une encapsulation (entre 70 et 90%, CaCl_2 25mM). Par contre, il y a une augmentation nette (de l'ordre de 40%) par rapport aux valeurs obtenues pour une adsorption (CaCl_2 12,5mM, quelques soient la quantité d'ADN et le type d'enrobage à 292mM utilisés). (cfr tableau 2 et fig. 27)

Des observations similaires sont constatées pour le rendement d'encapsulation. La valeur obtenue (15,7%) avoisine celles évaluées pour l'adsorption (CaCl_2 12,5mM, quelques soient la quantité d'ADN et le type d'enrobage à 292mM utilisés). La différence par rapport aux valeurs obtenues pour une encapsulation (CaCl_2 25mM, quelque soit la quantité d'ADN utilisée) est encore plus frappante dans ce cas (diminution de l'ordre de 60%). (cfr tableau 2 et fig. 27)

Il apparaît donc que la **concentration en CaCl_2 influence les rendements** d'encapsulation et d'adsorption. De nouveau, cette influence sera jugée significative par application d'un test statistique approprié.

B. Une solution plus concentrée de mannose permettrait-elle d'améliorer le rendement d'adsorption ?

Le mannose a une masse molaire plus ou moins 2 fois plus petite que celle du cellobiose. Or, la même concentration a été utilisée dans les deux cas, à savoir 292mM. Une adsorption a donc été réalisée avec 1000 µg de pDNAG et avec une *solution de mannose 700 mM*, dans des conditions semblables à celles utilisées pour la fabrication de ces mêmes particules mais avec une solution de mannose 292mM. Le *rendement d'adsorption*, obtenu à partir de trois échantillons indépendants, est de **4,8 %**.

Il semble donc qu'*une concentration trop élevée en mannose diminue le rendement d'adsorption du pDNAG*.

Ce résultat n'est pas tellement étonnant. En effet, le sucre joue un rôle de « colle » qui permet non seulement à la molécule d'intérêt d'être adsorbée sur les nanoparticules, mais également *aux nanoparticules de s'agglutiner entre elles*. Or, l'espace partagé avec une autre nanoparticule est un espace en moins pour l'adsorption de la molécule d'intérêt (le pDNAG en l'occurrence). Ceci peut probablement justifier le faible rendement d'adsorption obtenu.

3.2.2.4. Questions en suspens

Les tests que nous avons effectués ont montré que

- L'adsorption et l'encapsulation d'ADN plasmidique sont aisées et donnent, dans des conditions données, de bons rendements.
- Ramener le temps de manipulation à 2 ou 3 jours (versus les 11 du protocole initial) ne semble pas affecter le rendement.
- Le changement de sucre (mannose versus cellobiose) ne semble pas induire des résultats trop différents.

Il reste encore des questions en suspens :

- Le protocole, sous sa forme modifiée (réduction à 2 ou 3 jours), n'affecte pas le rendement. Qu'en est-il des propriétés physico-chimiques ?
- Quelle est la charge globale des nanoparticules seules ? avec le pDNAG adsorbé (CaCl₂ 12,5 mM et 25mM) ? avec le pDNAG encapsulé (CaCl₂ 12,5 mM et 25mM) ?
- La lyophilisation va-t-elle modifier les propriétés physico-chimiques de ces nanoparticules ?
- La vitesse d'agitation influence-t-elle la taille des particules (comme dans le cas du PLGA, point 3.2.1.3.) ?, influence-t-elle l'aggrégation des particules ?
- Ces nanoparticules de CaPO₄ protègent-elles l'ADN plasmidique de la dégradation par les DNases ? Cette dernière question a été résolue au point 3.2.3.2. ci-dessous.

3.2.3. Comparaison de différents SDV

3.2.3.1. Rendement relatif

Les rendements d'encapsulation et d'adsorption ont tous été calculés en rapportant la **quantité** de pDNAG **finale** sur la **quantité** de pDNAG **initiale**. Les valeurs obtenues sont des valeurs relatives qui peuvent donc être comparées entre elles.

Le tableau 3 et la figure 29 reprennent les différents SDV qui ont été testés.

	Mode de fabrication	Quantité d'ADN utilisée	Concentration en CaCl ₂	Enrobage (type et concentration)	Mode de dégradation	Rendement	
						Moyenne	Ecart-type
Microparticules de PLGA (RG505)	Encapsulation	2 mg		NON	NaOH	41 **	34,6
	Adsorption	1 mg		NON		17 **	2,55
Nanoparticules de CaPO ₄	Encapsulation	200 µg	25 mM	NON	EDTA	72,7 ***	4,01
		500 µg	25 mM	NON		79,3 ***	4,02
			25 mM	Cellobiose (292mM)		84,7 **	3,54
			25 mM	Mannose (292mM)		74,7 **	0,99
			25 mM	NON		73,7 ***	10
			12,5 mM	NON		15,7 **	0,35
	Adsorption	200 µg	12,5 mM	Cellobiose (292mM)		16 *	
			12,5 mM	Mannose (292mM)		38 *	
		500 µg	12,5 mM	Cellobiose (292mM)		11,2 *	
			12,5 mM	Mannose (292mM)		15,8 *	
		1000 µg	12,5 mM	Cellobiose (292mM)		17,7 **	0,14
			12,5 mM	Mannose (292mM)		17,3 ***	1,86
			12,5 mM	Mannose (700mM)		4,8 ***	0,44
			25 mM	Mannose (292mM)		65,8 ***	3,98

* n = 1

** n = 2

*** n = 3

Tableau 3: Comparaison du rendement relatif de différents SDV

Les **nanoparticules de CaPO₄** fabriquées avec une solution de **CaCl₂ 25mM** tant dans le cas d'une encapsulation que dans le cas d'une adsorption **se démarquent** nettement des autres SDV.

Cependant, un meilleur rendement n'est pas forcément synonyme d'un meilleur potentiel vaccinal. Seuls les tests d'immunisation (et la réponse du système immunitaire lors d'une infection ultérieure par le BRSV) permettront d'évaluer cet aspect.

3.2.3.2. Protection de l'ADN plasmidique contre l'action des DNases

La protection de l'ADN plasmidique contre l'action des DNases présentes dans l'organisme est un des aspects importants évoqués (cfr point 1.4. de la partie « Introduction » page 10). Les SDV fabriqués ont donc été mis en présence de DNase I comme décrit au point 2.7. de la partie « Matériels et Méthodes » page 26 afin de montrer s'ils protègent ou non le pDNAG.

L'analyse de gel représenté à la figure 30 montre que :

- l'***encapsulation du pDNAG dans les microparticules de PLGA*** semble ***protéger complètement*** l'ADN plasmidique de la dégradation par la DNase I (profil plasmidique et intensité de bandes semblables dans les puits 2 et 3). Ce résultat est comparable à ce qu'on trouve dans la littérature (cfr ref. 76).

- l'***adsorption du pDNAG sur les microparticules de PLGA*** semble ***protéger partiellement*** l'ADN plasmidique de la dégradation par la DNase I (diminution du ratio des différentes isoformes plasmidiques et diminution de l'intensité des bandes dans le puits 5, contrairement au puits 4).

- l'***encapsulation ou l'adsorption de pDNAG dans ou sur des nanoparticules de CaPO₄*** semble, par contre, ***ne pas protéger*** l'ADN plasmidique de la dégradation par la DNase I (aucune trace de plasmide dans les puits 7, 9, 11, 13 et 15 correspondant aux nanoparticules de CaPO₄ mises en présence de DNase I).

Il faut cependant préciser que le protocole initial du test de digestion à la DNase I a dû être modifié. Des problèmes sont en effet survenus lors des contrôles ; le contrôle positif n'était pas bon (l'ADN plasmidique n'était pas dégradé). La dose de DNase I a alors été considérablement augmentée pour vérifier si le problème venait de l'activité enzymatique ou de la quantité d'enzyme mise au contact de l'ADN plasmidique. La deuxième solution s'est avérée être la bonne et la concentration utilisée pour la validation du test a été conservée pour réaliser le test sur les particules. Il est possible que cette concentration soit trop élevée.

Il serait donc intéressant dans un premier temps de déterminer la concentration minimale de DNase I à utiliser pour réaliser le test. Dans un deuxième temps, d'utiliser cette concentration minimale dans le test de digestion à la DNase I sur les particules.

3.3. Tests d'immunisation

3.3.1. Préalables

Avant toute immunisation, il est important de s'assurer que le matériau vaccinal utilisé soit susceptible d'induire une réponse du système immunitaire. Pour le vaccin ADN, il s'agit de vérifier que la protéine encodée par le gène porté par le plasmide soit bien exprimée. En effet, le but de l'administration d'ADN plasmidique est d'amener les cellules hôtes à synthétiser la protéine immunogène encodée, l'objectif final étant la mise en place d'une réponse immunitaire appropriée susceptible, lors d'un contact ultérieur avec l'agent pathogène en question, d'éliminer cet agent.

Pour s'assurer de la capacité de la cellule hôte à produire la protéine encodée, un test de transfection, l'équivalent de la transformation bactérienne, a été réalisé *in vitro* sur des cellules mammaliennes (cellules COS) selon le protocole décrit au point 2.8.1. de la partie « Matériel et Méthodes » page 26.

Un immunomarquage a permis d'identifier les protéines exprimées.

Les résultats obtenus permettent de dire que la protéine G, encodée par le gène porté par le pDNAG, est bien exprimée.

Les tests d'immunisation peuvent donc être réalisés.

3.3.2. Tests d'immunisation et tests ELISA

Le tableau 4 reprend les schémas de vaccination testés.

Des souris femelles hybrides, âgées de 6 à 8 semaines, sont inoculées par injection *intramusculaire* (au niveau des pattes postérieures) et/ou par voie *sous-cutanée* (au niveau du dos). La *dose* administrée est de **100 µg / souris** sauf pour les microparticules cationiques de PLGA (50 µg / souris, groupes 3 et 7) et le contrôle positif (Baculovirus exprimant la protéine G du BRSV, 200µg / souris, groupe 6).

Un prélèvement rétro-orbital est effectué avant injection et constitue le contrôle négatif préimmunitaire. Les contrôles et les rappels sont effectués 15 jours après la primo-vaccination, et ensuite, de 15 en 15 jours pendant 8 semaines.

Le mémoire portant sur l'utilisation du pDNAG comme matériau vaccinal, les tests d'immunisation ont été réalisés, dans un premier temps, avec celui-ci.

Les microparticules cationiques de PLGA, extrêmement difficiles à remettre en suspension, n'ont pas pu être injectées par voie IM (groupe 3). De plus, le rendement d'adsorption très faible n'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante de pDNAG pour mener à bien le schéma initialement prévu (100 µg/souris).

45 jours après son administration, le pDNAG seul (groupe 1) ne donne pas de réponse dans le système de détection utilisé. Par contre, le groupe de souris « témoins » injectées avec le Baculovirus exprimant la protéine G (groupe 6) répond, quant à lui, dans notre système. (cfr tests ELISA).

Le pDNAG (susceptible d'induire la synthèse de la protéine G) administré seul ne donnant pas de réponse, l'absence de réponse des différents SDV ne doit pas surprendre. Le changement de véhicule a peu de chance de modifier le comportement du vecteur plasmidique sauf s'il joue un rôle adjuvant.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce manque de réponse.

La première est l'*absence d'expression de la protéine G* encodée par le gène du plasmide. Or, le test de transfection *in vitro* du pDNAG (cfr point 3.3.1. ci-dessus) a révélé l'expression de cette protéine G. Il semble donc peu probable que le problème soit à ce niveau. Une expression quantitativement réduite *in vivo* ne peut cependant être exclue.

La deuxième est un *manque d'immunogénicité* de la protéine G. Or, *la protéine G recombinante induit une réponse après 30 jours* (BacG, groupe 6). Il semble, de nouveau, que la cause soit ailleurs.

Troisième hypothèse : la *dose* administrée est trop faible que pour induire une réponse immunitaire détectable. Augmenter la dose administrée permettrait de vérifier cette hypothèse.

Autre hypothèse possible : les *Ac* produits et contenus dans les séra murins *ne peuvent être mis en évidence* par le test ELISA utilisé.

Cette absence de réponse empêche toute évaluation du pouvoir adjuvant des SDV testés et empêche donc d'évaluer et de comparer la réponse immunitaire induite par la vaccination avec les nanoparticules de CaPO₄ mises au point. Leur facilité de fabrication et leur faible coût de production, ainsi que les très bons rendements obtenus (CaCl₂ 25mM) en feraient un SDV très intéressant. Cependant, à ce jour, pour ce qui est des vaccins ADN, aucune publication n'est venue soutenir cette approche.

En conséquence de cette absence de réponse, une démarche comparable a alors été initiée avec un plasmide portant le gène codant pour la protéine F (pDNAF).

Le pDNAF a été fourni par l'équipe qui travaille en collaboration avec nous sur ce projet. Ce plasmide a déjà été testé comme support de vaccination de modèles murins, modèles où il a été administré seul (sans adjuvant) par voie IM et SC à raison de 100 µg/souris (même schéma de vaccination que pour le pDNAG – groupe 1 –).

30 jours après son administration, contrairement au pDNAG, une réponse humorale est mise en évidence par le test ELISA utilisé pour l'étude.

Des protocoles d'immunisation sur souris ont donc été arrêtés avec le pDNAF comme matériau vaccinal (groupes 7 à 11).

Tous les groupes ont reçu une dose de 100 µg/souris par voie IM (excepté le groupe 7, vacciné avec les microparticules cationiques, pour les raisons évoquées ci-dessus).

Les tests ELISA réalisés 15 jours après la primo-vaccination ne mettent pas en évidence d'Ac anti-protéine F. Il semble cependant qu'il faille attendre la 4^e semaine pour voir apparaître un début de réponse immunitaire (cfr expériences précédentes avec le pDNAF).

Les réponses à 4 semaines décideront sans doute de la pertinence de l'approche choisie. Ces réponses seront cependant trop tardives que pour être incluses dans le présent travail. Si elles sont disponibles, elles seront intégrées à la présentation de ce travail.

A côté de la réponse humorale, la réponse cellulaire.

L'étude de cette réponse nécessite le prélèvement de lymphocytes T cytotoxiques chez le sujet vacciné, les souris doivent dès lors être sacrifiées afin de leur prélever la rate (organe lymphoïde effecteur).

Ces tests ne seront réalisés qu'une fois l'évaluation de la réponse humorale terminée.

4. Conclusions et Perspectives :

Les nombreux efforts consentis pour optimiser l'efficacité vaccinale (amélioration et développement de nouveaux matériaux vaccinaux, amélioration et développement de nouveaux adjuvants, utilisation de nouvelles voies d'administration) ont permis d'augmenter les possibilités de formulations vaccinales et d'adapter celles-ci à l'agent pathogène étudié. Néanmoins, la mise au point d'un vaccin RSV reste, de nos jours, un challenge à relever.

Les vaccins BRSV actuellement commercialisés doivent être améliorés car

- ils ne sont ***pas très efficaces*** chez les jeunes veaux sous couvert colostrale (en présence d'Ac maternels).
- dans certains cas, les vaccins induisent des ***phénomènes immunopathologiques*** graves qui seraient liés à une mauvaise orientation de la réponse immunitaire (déséquilibre vers la voie Th2), responsable d'une exacerbation des symptômes cliniques lors d'une infection ultérieure par une souche sauvage du BRSV.
- la protection conférée par ces vaccins n'est que ***de courte durée***.
- la voie d'entrée et la pathologie étant localisées au niveau des voies respiratoires, y induire une protection locale (réponse de type ***mucosal***) pourrait être une démarche pertinente.

L'objectif de ce travail a été de développer de nouvelles formes vaccinales susceptibles de générer une protection efficace, spécifique et durable contre le BRSV.

Le choix du matériau vaccinal s'est porté sur le ***vaccin ADN*** car

- n'étant ***pas inactivé par les Ac maternels***, il devrait être efficace chez de jeunes veaux sous couvert colostrale.
- il induit une ***réponse*** immunitaire tant humorale que ***cellulaire***.

La première partie du travail a été consacrée à l'optimisation des conditions de purification à grande échelle du pDNAG fourni par le Dr Keil.

La souche d'*E. coli* **Tg1** s'est révélée être la souche permettant de produire et de purifier la plus grande quantité de pDNAG. De plus, les modifications du protocole de purification de Qiagen semblent avoir permis d'augmenter considérablement la quantité de pDNAG purifiée.

Une fois les conditions optimales réunies, ce pDNAG a été formulé dans différents ***SDV*** pour tenter d'induire une ***réponse immunitaire spécifique et durable***.

Parmi ceux-ci, les ***microparticules de PLGA*** ont été sélectionnées car :

- elles assurent la ***protection du matériau encapsulé***.
- elles permettent une ***libération lente et contrôlée*** du matériau vaccinal.
- elles sont ***biocompatibles et biodégradables***.

- elles sont ***capturées par les APC*** (pour les particules dont la taille est inférieure à 10 µm).
- elles peuvent être ***capturées par les tissus lymphoïdes***.
- elles sont capables d'induire ***une réponse immunitaire tant humorale que cellulaire et tant systémique que mucosale***.

(cfr ref 15).

La technique de double émulsion (inspirée de Jeffery et al. 1993, ref 30), utilisée pour produire des microparticules de PLGA contenant le pDNAG, n'ayant pas permis d'obtenir des résultats reproductibles, le développement de microparticules cationiques de PLGA a alors été envisagé.

Ces microparticules, grâce aux charges positives qu'elles portent, permettent d'adsorber des polyanions tels que de l'ADN.

La technique utilisée (cfr ref 66) semble reproductible.

Une amélioration du rendement d'adsorption a pu être obtenue en diminuant le nombre de lavages des microparticules (augmentation de 5 à 10 %).

Cependant, l'« hyperaggrégation » observée rend son utilisation vaccinale hypothétique.

Ce type de SDV a donc été abandonné au profit des nanoparticules de CaPO₄.

Ces nanoparticules possèdent des avantages très intéressants pour une vaccination anti-virale :

- elles sont ***biodégradables et biocompatibles***
- elles peuvent être ***capturées par les APC*** (grâce à leur taille).
- elles induisent une ***réponse immunitaire cellulaire***
- elles sont capables d'induire une ***réponse immunitaire mucosale***
- elles sont capables d'induire une ***immunité à long terme***

(cfr ref 20 et 21)

De plus, elles ont l'avantage d'avoir un ***coût de fabrication nettement inférieur*** à celui que nécessite l'utilisation du PLGA.

Le protocole original (cfr ref 20 et 21) a subi des modifications au niveau du matériau vaccinal (plasmidique au lieu de protéique), du procédé (encapsulation au lieu d'adsorption) et au niveau de l'enrobage (mannose au lieu de cellobiose).

Nous avons montré que les nanoparticules fabriquées avec une solution de CaCl₂ 25mM (encapsulation ou adsorption – solution « sucrée » 292mM) donnent de très bons rendements (de 65 à 85 %).

Une fois les SDV préparés, les tests d'immunisation sur modèles murins ont pu être initiés. Face aux résultats négatifs obtenus (tests ELISA), des formulations substituant le pDNAF au pDNAG ont été produites afin de pouvoir évaluer le pouvoir adjuvant des différents SDV.

Le temps nécessaire pour obtenir des SDV « prêts à l'emploi » étant assez long, les tests d'immunisation n'ont pu commencer que dans le courant du mois de juillet.

Les résultats obtenus, 15 jours après administration vaccinale, sont, à ce jour, négatifs.

Les tests d'immunisation ont été réalisés soit avec le pDNAG, soit avec le pDNAF. Une co-encapsulation ou une co-adsorption des deux plasmides (pDNAG et pDNAF) est une technique possible. Y aurait-il synergie ?

Une chose doit être soulignée : chaque paramètre du protocole de vaccination a son importance ; toute modification du matériau vaccinal, de l'adjuvant, de la voie d'administration, de l'espèce,... peut engendrer une modification de la réponse du système immunitaire.

D'autres modifications peuvent donc être apportées au protocole de vaccination choisi :

- Une administration par *voie mucosale*.

L'intérêt d'induire une protection au niveau des muqueuses, voies d'accès obligées de nombreux agents pathogènes pour coloniser l'organisme, a été souligné précédemment (cfr points 1.3.2.2. et 1.5.3.1. de la partie « Introduction »).

Il est dommage que, disposant des moyens nécessaires pour tenter une vaccination par voie mucosale, la voie systémique ait été choisie.

Des expériences ont montré que la vaccination par *voie systémique* n'induisait *pas de protection au niveau mucosal*.

Par contre, les vaccins administrés par *voie mucosale*, produisent à la fois une réponse locale avec la production d'IgA sécrétoires, et une immunité systémique avec l'induction de réponse T helper (CD4+, Th2) et cytotoxique (CD8+, Th1). (cfr ref 12, 20, 46 et 59).

- Dans cette optique de « vaccination mucosale », d'autres SDV pourraient être testés tels
 - le *chitosan* ou l'*alginate*, polymères saccharidiques doués de propriétés muco-adhésives pour permettre une *immunisation mucosale durable* (cfr ref. 74 et 75).
 - les *ISCOMS*, complexes composés de cholestérol et de Quil A, capables d'induire une *réponse cellulaire tant systémique que mucosale*, grâce à leur grand pouvoir adjuvant (cfr ref. 23 et 45).
- Une vaccination sur *modèle bovin*, l'hôte naturel du BRSV.

L'étude de la réponse immunitaire du sujet vacciné lors d'un challenge (inoculation post-vaccinale avec le virus contre lequel on souhaite immuniser) doit encore être réalisée. Cette étude permettra, notamment via l'apparition ou non de symptômes cliniques, d'évaluer le pouvoir protecteur de la forme vaccinale administrée.

5. Bibliographie :

1. **Al Mariri,A.; Tibor,A.; Lestrade,P.; Mertens,P.; De,Bolle,X; Letesson,J.J.** *Yersinia enterocolitica as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding Brucella abortus bacterioferritin or P39antigen* Infect.Immun. 2002 , 70, 4, 1915-1923
2. **American Society for microbiology (97° congrès annuel)** *Nouveaux vaccins*
La lettre de l'infectiologue 1997, 12, 8, 372-374
3. **Anderson,J.M.; Shive,M.S.** *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres* Adv.Drug Deliv.Rev. 1997, 28, 1, 5-24
4. **Ando,S.; Putnam,D.; Pack,D.W.; Langer,R.** *PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization* J.Pharm.Sci. 1999, 88, 1, 126-130
5. **Babiuk,L.A.; Lawman,M.J.; Ohmann,H.B.** *Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease* Adv. Virus Res. 1988, 35, 219-249
6. **Bastien,N.; Taylor,G.; Thomas,L.H.; Wyld,S.G.; Simard,C.; Trudel,M.** *Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host* Vaccine 1997, 15, 12-13, 1385-1390
7. **Bembridge,G.P.; Rodriguez,N.; Garcia-Beato,R.; Nicolson,C.; Melero,J.A.; Taylor,G.** *Respiratory syncytial virus infection of gene gun vaccinated mice induces Th2-driven pulmonary eosinophilia even in the absence of sensitisation to the fusion (F) or attachment (G) protein* Vaccine 2001, 19, 1038-1046
8. **Bosset, S.; Cousin, F.; Sauret, V.; Vincent, L.; Pacheco, Y.; Nicolas, JF.** (2000)
Les bases en immunologie
<http://www.univ-lille2.fr/medtrav2000/Lepointsurapprofondir/lepointsurapprofondir.htm>
9. **Bukreyev,A.; Belyakov,I.M.; Berzofsky,J.A.; Murphy,B.R.; Collins,P.L.**
Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates viral replication and increases the level of pulmonary antigen-presenting cells J Virol, 2001, 75, 24, 12128-12140
10. **Burton, DR.** *Review: IgG functional sites* Mol. Immunol., 1985, 22, 161-206
11. **Cano,F.; Plotnicky-Gilquin,H.; Nguyen,T.N.; Liljeqvist,S.; Samuelson,P.; Bonnefoy,J.; Stahl,S.; Robert,A.** *Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides* Vaccine, 2000, 18, 24, 2743-2752
12. **Challacombe,S.J.; Rahman,D.; Jeffery,H.; Davis,S.S.; O'Hagan,D.T.** *Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen* Immunology , 1992, 76, 1, 164-168
13. **Delforge, JL.; Zygraich, N.** *Evaluation clinique d'un vaccin vivant atténué pour l'immunisation des bovins contre le virus respiratoire syncytial* Ann. Med. Vet. , 1978, 122, 545-553
14. **Devoisselle, JM.** *Les liposomes: structure, propriétés et comportement in vivo* La lettre de l'infectiologue, 1999, 14, 3, 18-20

15. Erni,C.; Suard,C.; Freitas,S.; Dreher,D.; Merkle,H.P.; Walter,E. *Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells* *Biomaterials* 2002, 23, 23, 4667-4676
16. Faraasen,S.; Voros,J.; Csucs,G.; Textor,M.; Merkle,H.P.; Walter,E. *Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate* *Pharm.Res.* 2003, 20, 2, 237-246
17. Gurunathan,S.; Klinman,D.M.; Seder,R.A. *DNA vaccines: immunology, application, and optimization** *Annu.Rev.Immunol.* 2000, 18, 927- 974
18. Halpern,M.D.; Kurlander,R.J.; Pisetsky,D.S. *Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha* *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78
19. He, Q.; Bell, S.; Morco T. *Therapeutic calcium phosphate particles and methods of manufacture and use* 2002 US Patent 6,355,271
20. He,Q.; Mitchell,A.; Morcol,T.; Bell,S.J. *Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2* *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 2002, 9, 5, 1021-1024
21. He,Q.; Mitchell,A.R.; Johnson,S.L.; Wagner-Bartak,C.; Morcol,T.; Bell,S.J. *Calcium phosphate nanoparticle adjuvant* *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 2000, 7, 6, 899-903
22. Hsu,K.H.; Lubeck,M.D.; Bhat,B.M.; Bhat,R.A.; Kostek,B.; Selling,B.H.; Mizutani,S.; Davis,A.R.; Hung,P.P. *Efficacy of adenovirus-vectored respiratory syncytial virus vaccines in a new ferret model* *Vaccine*, 1994, 12, 7, 607-612
23. Hu,K.F.; Lovgren-Bengtsson,K.; Morein,B. *Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination* *Adv.Drug Deliv.Rev.*, 2001 ,51, 1-3, 149-159
24. Huang,Y.; Anderson,R. *Enhanced immune protection by a liposome-encapsulated recombinant respiratory syncytial virus (RSV) vaccine using immunogenic lipids from Deinococcus radiodurans* *Vaccine*, 2002, 20, 11-12, 1586-1592
25. Internet *Le point sur les vaccins du futur* 2002
<http://www.gazettelabo.tn.fr/2002archives/pratic/2002/64VACCINS.htm>
26. Internet *La vaccination* <http://www.museum-grenoble.fr/passe/sciencefete/4/vaccination1.html>
27. Iqbal,M.; Lin,W.; Jabbal-Gill,I.; Davis,S.S.; Steward,M.W.; Illum,L. *Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice* *Vaccine*, 2003, 21, 13-14, 1478-1485
28. Jain,R.A. *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices* *Biomaterials*, 2000, 21, 23, 2475- 2490
29. Jain,R.A.; Rhodes,C.T.; Railkar,A.M.; Malick,A.W.; Shah,N.H. *Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables* *Eur.J.Pharm.Biopharm.*, 2000, 50, 2, 257- 262
30. Jeffery,H.; Davis,S.S.; O'Hagan,D.T. *The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticlesI. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique* *Pharm.Res.*, 1993, 10, 3, 362- 367

31. Kim, HW.; Canchola, JG.; Brandt, CD.; Pyles, G.; Chanock, RM.; Jensen, K.; Parrot, RH. *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine* Am.J.Epidemiol., 1969, 89, 422- 434
32. Kimman,T.G.; Sol,J.; Westenbrink,F.; Straver,P.J. *A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory syncytial virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine* Vet.Q., 1989, 11, 4, 250-253
33. Kimman,T.G.; Terpstra,G.K.; Daha,M.R.; Westenbrink,F. *Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: evidence for the involvement of complement and mast cell mediators* Am.J.Vet.Res., 1989, 50, 5, 694-700
34. Klinman,D.M.; Yi,A.K.; Beaucage,S.L.; Conover,J.; Krieg,A.M. *CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1996, 93, 2879-2883
35. Krauzewicz,N.; Cox,C.; Soeda,E.; Clark,B.; Rayner,S.; Griffin,B.E. *Sustained ex vivo and in vivo transfer of a reporter gene using polyoma virus pseudocapsids* Gene Ther., 2000, 7, 13, 1094-1102
36. Kreiss, P.; Scherman, D. *Optimisation des plasmides et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique* Médecine/Science, 1999, 15, 5, 669-676
37. Krieg,A.M.; Wu,T.; Weeratna,R.; Efler,S.M.; Love-Homan,L.; Yang,L.; Yi,A.K.; Short,D.; Davis,H.L. *Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1998, 95, 12631-12636
38. Ladenheim R. *Les vaccins à ADN nu* Biofutur, 1995, 145, 15-21
39. Larsen LE; *Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review* Acta Vet Scand, 2000, 41, 1, 1-24
40. Larsen,L.E.; Tegtmeier,C.; Pedersen,E. *Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination* Acta Vet.Scand., 2001, 21, 1, 113-121
41. Letesson JJ *Immunologie comparée des virus RS humain et bovin* Le Point Vétérinaire, 2003, 232, 26-29
42. Letesson JJ *Vaccination des bovins contre le RSV : des obstacles difficiles à surmonter* Le Point Vétérinaire, 232, 61-64
43. Levy,M.S.; Lotfian,P.; O'Kennedy,R.; Lo-Yim,M.Y.; Shamlou,P.A. *Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using a fluorescence-based method* Nucleic Acids Res., 2000, 28, 12, E57
44. Li,X.; Sambhara,S.; Li,C.X.; Ewasyshyn,M.; Parrington,M.; Caterini,J.; James,O.; Cates,G.; Du,R.P.; Klein,M. *Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization* J.Exp.Med., 1998, 188, 4, 681-688
45. Maloy,K.J.; Donachie,A.M.; Mowat,A.M. *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses by oral or parenteral immunization with ISCOMS* Eur.J.Immunol., 1995, 25, 10, 2835-2841
46. Maloy,K.J.; Donachie,A.M.; O'Hagan,D.T.; Mowat,A.M. *Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles* Immunology, 1994, 81, 1, 661-667

47. Meignier, B.; Haensler, J.; Ronco, J.; Krishnan, S.; Meulien P. *Nouvelles technologies vaccinales* La lettre de l'infectiologie, 1997, Suppl 6, 20, 24
48. Miller, M.; Cho, J.Y.; Baek, K.J.; Castaneda, D.; Nayar, J.; Rodriguez, M.; Roman, M.; Raz, E.; Broide, D.H. *Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein protects against RSV-induced airway hyperresponsiveness* Vaccine, 2002, 20, 23-24, 3023-3033
49. Morein, B. *The ISCOM antigen-presenting system* Nature, 1988, 332, 287-288
50. O'Donnell, P.B.; McGinity, J.W. *Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique* Adv. Drug Deliv. Rev., 1997, 28, 1; 25-42
51. O'Hagan, D.T.; McGee, J.P.; Holmgren, J.; Mills, K.H.; Rahman, D.; Challacombe, S.J. *Biodegradable microparticles for oral immunisation* Vaccine, 1993, 11, 2, 149-154
52. O'Hagan, D.T.; Singh, M.; Gupta, R.K. *Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines* Adv. Drug Deliv. Rev., 1998, 32, 3, 225-246
53. Park, E.K.; Soh, B.Y.; Jang, Y.S.; Park, J.H.; Chung, G.H. *Immune induction and modulation in mice following immunization with DNA encoding F protein of respiratory syncytial virus* Mol. Cells, 2001, 12, 1, 50-56
54. Parkin, J.; Cohen, B. *An overview of the immune system* Lancet, 2001, 357, 9270, 1777-1789
55. Prescott; Harley; Klein *Microbiologie* Editions De Boeck, 1995
56. Pron, B.; Gaillard, J.L. *Importance des cellules dendritiques dans la physiopathologie des Infections* La lettre de l'infectiologie, 1999, 14, 8, 355-359
57. Qiagen *Qiagen plasmid purification handbook*, 2002
58. Ribet, C. *Développement de vecteurs particuliers à base de polymères biodégradables pour l'administration mucosale de vaccins protéiques et plasmidiques* Mémoire - Université catholique de Louvain - Ecole de Pharmacie, 1999
59. Saliou, P. *Vaccinologie et nouveaux vaccins* La lettre de l'infectiologie, 1999, 14, 9, 425-426
60. Salk, J.; Salk, D. *Control of influenza and poliomyelitis with killed virus vaccines* Science, 1977, 195, 834-847
61. Schmidt U; Beyer J; Polster U; Gershwin LJ; Buchholz UJ; *Mucosal immunization with live recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and recombinant BRSV lacking the envelope glycoprotein G protects against challenge with wild-type BRSV* J Virol, 2002, 76, 23, 12355-12359
62. Schreiber P; Matheise JP; Dessy F; Heimann M; Letesson JJ; Coppe P; Collard A; *High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2000, 47, 7, 535-550
63. Schrijver RS; Langedijk JP; Keil GM; Middel WG; Maris-Veldhuis M; van Oirschot JT; Rijsewijk FA; *Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV* Vaccine, 1997, 15, 17-18, 1908-1916

64. **Sharma,A.K.; Woldehiwet,Z.; Walrevens,K.; Letteson,J.** *Immune responses of lambs to the fusion (F) glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus expressed on insect cells infected with a recombinant baculovirus* Vaccine, 1996, 14, 8, 773-779
65. **Shimizu,Y.; Yamakami,K.; Gomi,T.; Nakata,M.; Asanuma,H.; Tadakuma,T.; Kojima,N.** *Protection against Leishmania major infection by oligomannose-coated liposomes* Bioorg.Med.Chem., 2003, 11, 7, 1191-1195
- 66.**Singh,M.; Briones,M.; Ott,G.; O'Hagan,D.** *Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2000, 97, 2, 811-816
- 67.**Singh,M.; Ugozzoli,M.; Briones,M.; Kazzaz,J.; Soenawan,E.; O'Hagan,D.T.** *The effect of CTAB concentration in cationic PLG microparticles on DNA adsorption and in vivo performance* Pharm.Res. ,2003, 20, 2, 247-251
- 68.**Sory,M.P.; Hermand,P.; Vaerman,J.P.; Cornelis,G.R.** *Oral immunization of mice with a live recombinant Yersinia enterocolitica O:9 strain that produces the cholera toxin B subunit* Infect.Immun., 1990, 58, 8, 2420-2428
- 69.**Tan,M.C.; Mommaas,A.M.; Drijfhout,J.W.; Jordens,R.; Onderwater,J.J.; Verwoerd,D.; Mulder,A.A.; van der Heiden,A.N.; Ottenhoff,T.H.; Cella,M.; Tulp,A.; Neefjes,J.J.; Koning,F.** *Mannose receptor mediated uptake of antigens strongly enhances HLA-class II restricted antigen presentation by cultured dendritic cells* Adv.Exp.Med.Biol., 1997, 417, 171-174
- 70.**Taylor,G.; Rijsewijk,F.A.; Thomas,L.H.; Wyld,S.G.; Gaddum,R.M.; Cook,R.S.; Morrison,W.I.; Hensen,E.; van Oirschot,J.T.; Keil,G.** *Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV* J.Gen.Virol., 1998, 79, 7, 1759-1767
- 71.**Taylor,G.; Thomas,L.H.; Furze,J.M.; Cook,R.S.; Wyld,S.G.; Lerch,R.; Hardy,R.; Wertz,G.W.** *Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions* J.Gen.Virol., 1997, 78, 12, 3195-3206
- 72.**Toda,S.; Ishii,N.; Okada,E.; Kusakabe,K.I.; Arai,H.; Hamajima,K.; Gorai,I.; Nishioka,K.; Okuda,K.** *HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody* Immunology, 1997, 92, 1, 111-117
- 73.**Ulmer,J.B.; Donnelly,J.J.; Parker,S.E.; Rhodes,G.H.; Felgner,P.L.; Dwarki,V.J.; Gromkowski,S.H.; Deck,R.R.; DeWitt,C.M.; Friedman,A.; .** *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein* Science, 1993, 259, 5102, 1745-1749
- 74.**van der Lubben,I; Kersten,G.; Fretz,M.M.; Beuvery,C.; Coos,Verhoef J.; Junginger,H.E.** *Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice* Vaccine, 2003, 21, 13-14, 1400-1408
- 75.**van der Lubben,I; Verhoef,J.C.; Borchard,G.; Junginger,H.E.** *Chitosan for mucosal vaccination* Adv.Drug Deliv.Rev., 2001, 52, 2, 139-144
- 76.**Wang,D.; Robinson,D.R.; Kwon,G.S.; Samuel,J.** *Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery* J.Control Release, 1999, 57, 1, 9-18

77. Wellemans, G.; Leunen, J. *Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires chez les bovins* Ann. Med. Vet., 1975, 119, 359-369
78. Wellemans, G.; Van Opdenbosch, E.; Boucque, CHV.; Leunen, J.; Strobbe, R. *Vaccination des bovins contre le virus respiratoire bovin au moyen d'une souche atténuée* Ann. Med. Vet., 1978, 122, 527-535
79. Wiley, J. *Procedures in Electron Microscopy* Chichester, New York, Brisbane, Toronto and Singapore, 1993,
80. Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo* Science, 1990, 247, 4949 Pt 1, 1465-1468
81. Woo, P.C.; Wong, L.P.; Zheng, B.J.; Yuen, K.Y. *Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated Salmonella typhimurium* Vaccine, 2001, 19, 20-22, 2945-2954
82. Yamaguchi, I.; Itoh, S.; Suzuki, M.; Sakane, M.; Osaka, A.; Tanaka, J. *The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties* Biomaterials, 2003, 24, 12, 2031-2036

Références figures et tableaux:

Figure 1 :

83. Internet www.lifesci.utexas.edu/faculty/sjasper/images/john24.12.jpg

Figure 2 :

84. Internet www.lifesci.utexas.edu/faculty/sjasper/images/john24.13.jpg

Figure 3 : ref. 14

Figure 5 :

85. Walravens, K. *Variabilité et potentiel vaccinal des glycoprotéines d'enveloppe F et G du BRSV* Thèse 1997

Figure 6 :

86. Internet <http://www.bio.warwick.ac.uk/easton/IMAGES/Diagrams/3dvirus.jpg>

Figure 7 :

87. Internet <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/00002180h.htm>

Figure 8 : ref. 57

Figures 9 et 10 : images tirées de la ref. 52

Figure 13 :

88. Lemoine, D. *Nano- and microspheres as potential nasal antigen delivery system* Thèse 1998

Figures 16, 20 et 21 : ref. 57

Figure 22 (1) :

89. Internet [http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS3\(2\)/M.Kumar/particles.htm](http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS3(2)/M.Kumar/particles.htm)

Figure 22 (2) :

90. Internet <http://www.health-pages.com/pp/krebs2.gif>

Tableau 1 : ref. 41